Дж. Г. Николс, А. Р. Мартин, Б. Дж. Валлас, П. А. Фукс

ОТ НЕЙРОНА К МОЗГУ



Дж. Г. Николлс, А. Р. Мартин,
Б. Дж. Валлас, П. А. Фукс

ОТ НЕЙРОНА К МОЗГУ

FROM NEURON TO BRAIN

FOURTH EDITION

John G. Nicholls
International School for Advanced Studies, Trieste, Italy

A. Robert Martin
Emeritus, University of Colorado School of Medicine

Bruce G. Wallace
University of Colorado School of Medicine

Paul A. Fuchs
The Johns Hopkins University School of Medicine

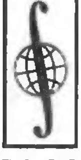


Sinauer Associates, Inc. • Publishers
Sunderland, Massachusetts • U.S.A.

Дж. Г. Николлс, А. Р. Мартин,
Б. Дж. Валлас, П. А. Фукс

ОТ НЕЙРОНА К МОЗГУ

Перевод с четвертого английского издания
под редакцией
П. М. БАЛАБАНА и Р. А. ГИНИАТУЛЛИНА



Москва • 2003

УРСС

ББК 28.70



Настоящее издание осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследовоний (проект № 02–04–62007)

Николлс Джон, Мартнн Роберт, Валлас Брюс, Фукс Пол

От нейрона к мозгу / Пер. с англ. П. М. Балабана, А. В. Галкина, Р. А. Гиниатуллина, Р. Н. Хазипова, Л. С. Хируга. — М.: Едиториал УРСС, 2003. — 672 с., цв. вкл.

ISBN 5–354–00162–5

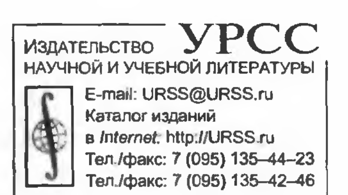
Цель нового издания знаменитой и ставшей классической в нейробиологии книги «От нейрона к мозгу» осталась той же, что и в первом издании, написанном 25 лет назад. В предисловии к этой книге цель декларирована как: «описать способы передачи сигналов нервными клетками, как сигналы анализируются и как на основе этой интеграции возникают высшие функции мозга. Книга предназначена читателю без специального образования, который интересуется принципами работы нервной системы». В новом издании четыре широко известных нейробиолога в том же ясном стиле описывают существуюшие факты, методические подходы и концепции, делая упор на экспериментальные данные, как классические, так и самые современные. Фактически более чем на три четверти это совершенно новая книга, так как бурный рост науки о мозге привел к удивительным открытиям в последние десятилетия. Книга снабжена огромным количеством иллюстраций, просто и четко излагаются не только каждая проблема, но и откуда она появилась, как связана с другими вопросами нейробиологии. Очень приятной особенностью книги является то, что авторы не опускают спорные вопросы, четко описывают альтернативные точки зрения и не стесняются сказать, что многие основные проблемы в настоящее время не решены.

Первое издание книги было переведено и стало настольным справочником по основным вопросам физиологии мозга для нескольких поколений русскоязычных исследователей. Первое издание входит как рекомендованная литература практически во все курсы, касаюшиеся работы мозга, для студентов медицинских и биологических вузов России. Надеемся, что новое полностью переработанное современное издание займет такое же место.

Издательство «Едиториал УРСС». 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, 9.
Лицензия ИД №05175 от 25.06.2001 г. Подписано к печати 12.05.2003 г.
Формат 70×100/16. Тираж 3000 экз. Печ. л. 42. Зак. № 327

Отпечатано в типографии ИПО «Профиздат». 109044, г. Москва, Крутицкий вал, 18.

ISBN 5–354–00162–5



1595 ID 6334
9 785354 001620

Оглавление

Предисловие редакторов русского перевода

Данная книга является переводом четвертого издания знаменитой и ставшей классической книги «От нейрона к мозгу». Первое издание этой книги, написанной Стефеном Куффлером и Джоном Николлсом в 1975 году, было переведено на русский язык и вышло в СССР в 1979 году под редакцией профессора Л. Г. Магазаника. Несмотря на большой тираж, книга быстро исчезла с прилавков магазинов и стала настольным учебником для нескольких поколений нейрофизиологов. Последующие английские издания книги были существенно переработаны новым коллективом авторов, однако ни второе, ни третье издание в России не выходили. Публикация на русском языке данного, четвертого издания стала возможной благодаря поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Возвращение к этой книге в начале нового тысячелетия кажется нам символичным — новое издание для нового поколения означает, надеемся, возрождение интереса к науке.

Цель нового издания, декларированная в предисловии к английскому изданию, осталась той же, что и первого, написанного более четверти века назад — «описать способы передачи сигналов нервными клетками, как сигналы анализируются и как на основе этой интеграции возникают высшие функции мозга». Однако, фактически, это новая книга, написанная в соответствии с бурным развитием нейробиологии последних лет. В предисловии, специально написанном к русскому переводу четвертого издания, Джон Николлс особо выделяет предмет «нейробиология» как междисциплинарную науку, способную интегрировать знания и подходы смежных наук. В России нейробиология пока не выделена в отдельный предмет, как это произошло в большинстве известных западных университетов. Книга «От нейрона к мозгу» может стать для студентов, по сути дела, учебником по нейробиологии. Мы намеренно представили часть текста в подписях к рисункам как на русском, так и на оригинальном английском языке. Нам кажется, что это позволит студентам и начинающим ученым легче освоить специфическую терминологию и быстрее интегрироваться в интернациональное научное сообщество.

Новая книга сохранила узнаваемые черты первого издания, такие как доступность и простота толкования самых сложных явлений в сочетании с высокой научностью, логично отслеженная взаимосвязь различных вопросов нейробиологии, огромное количество ярких наглядных иллюстраций. Объяснение каждого процесса ведется логично и последовательно, мысль авторов четка и ясна. Приятной особенностью книги является то, что авторы не опускают спорные вопросы, описывают альтернативные точки зрения и указывают на нерешенные в настоящее время проблемы. Последнее особенно ценно, поскольку это указания экспертов в этой области на перспективные направления возможного дальнейшего развития нейронауки. Не оставлен без внимания и исторический анализ развития представлений о работе мозга, что делает книгу эмоциональной и увлекательной.

Постоянным автором и главным инициатором всех четырех изданий является Джон Николлс (John Nicolls), профессор Международной высшей школы (SISSA) в Триесте (Италия). Другими авторами являются известные нейробиологи Брюс Валлас (Bruce G. Wallace) и Роберт Мартин (A. Robert Martin) (University of Colorado), а также Пол Фукс (Paul A. Fuchs) (The John Hopkins University). Все авторы внесли существенный личный вклад в разработку излагаемых проблем, что обеспечило «взгляд изнутри» на многие проблемы нейробиологии и привнесло в изложение особую достоверность и точность.

Первое издание «От нейрона к мозгу» до сих пор входит как рекомендованная литература практически во все курсы, касающиеся работы мозга, для студентов медицинских и биологических вузов России. Надеемся, что новое, полностью переработанное современное издание займет такое же место.

П. Балабан
Р. Гиниатуллин

Предисловие авторов к русскому изданию

При написании «От нейрона к мозгу» я и мои коллеги прежде всего преследовали цель создания легко читаемой книги, которая помогла бы студентам медицинских и биологических факультетов в освоении знаний о нервной системе. Мы надеялись, что книга будет полезна и исследователям в этой области, равно как и физикам, инженерам и молекулярным биологам.

Термины «нейробиология» и «нейронауки» вошли в обиход в 60-е годы XX в., когда Стивен Куффлер создал в медицинской школе Гарвардского университета первый факультет, сотрудниками которого стали физиологи, анатомы и биохимики. Работая вместе, они решали проблемы функционирования и развития нервной системы, исследовали молекулярные механизмы работы мозга. До этого ученые этих специальностей работали отдельно, и учебники того времени отражают существовавшее разделение. Настоящая книга представляет собой особый подход к экспериментальному анализу и отражает развитие ключевых концепций науки о мозге вне зависимости от используемых методов.

Авторы книги очень надеялись на то, что богато иллюстрированный материал будет легко доступен каждому студенту, который просто пролистает книгу и решит, стоит ли ее прочесть. Несмотря на то, что английский язык сейчас стал необходимой частью образования исследователя, текст не на родном языке всегда воспринимается труднее. Теряется та часть научного подхода, которую мы старались передать в книге: красота науки, элегантность экспериментов, связь между классическими исследованиями прошлых лет и открывающиеся сегодня горизонты будущего. Именно поэтому известие о том, что вскоре появится русский перевод последнего издания нашей книги, так радует авторов. Стивен Куффлер всегда надеялся, что его книга будет переведена на другие языки. Первое издание книги было блестяще переведено в 1979 году нашим другом профессором Львом Магазаником из Института эволюционной физиологии и биохимии АН СССР (Ленинград). С тех пор было сделано столько ключевых открытий и настолько изменилось наше понимание механизмов работы мозга, что появление на русском языке книги для студентов о современной нейронауке стало необходимостью.

Многие известные ученые России и бывшего СССР внесли огромный вклад в наше понимание биофизических, нейрохимических и высших функций мозга, что послужило основой для развития исследований синаптической передачи, передачи зрительного сигнала, механизмов моторного контроля, функций коры мозга и механизмов обучения. Этот вклад и создание признанных научных школ также лежат в основе появившегося в последнее время в мире нового интереса к нейронаукам.

Как всегда, авторы благодарят нашего издателя Э. Синауэра за помощь в издании оригинала и русского перевода. Мы благодарим наших друзей профессоров П. Балабана и Р. Гиниатуллина за их усилия по редактированию и выпуску российского издания. Переводчики Л. Хируг, Р. Хасипов и А. Галкин, вместе с редакторами быстро и профессионально завершили подготовку издания. Несомненным достоинством книги является сохранение оригинальных подписей на английском языке, что позволяет легче перейти к анализу мировой литературы.

Мы надеемся, что настоящее издание послужит дальнейшим стимулом к развитию интереса к бурно развивающимся в настоящее время нейронаукам, вклад в которые российских ученых неоспорим.

Джон Николлс
2003 г., *Триест*, *Италия*

Раздел I

ВВЕДЕНИЕ

Глава 1

Принципы передачи информации и структурная организация мозга

Центральная нервная система представляет собой непрерывно работающий конгломерат клеток, которые постоянно получают информацию, анализируют ее, перерабатывают и принимают решения. Мозг способен также брать инициативу на себя и производить координированные, эффективные мышечные сокращения для ходьбы, глотания или пения. Для регуляции многих аспектов поведения и для прямого или непрямого контроля всего тела, нервная система обладает огромным количеством линий коммуникаций, обеспечиваемых нервными клетками (нейронами). Нейроны представляют собой основную единицу, или составной блок, мозга. Наша задача — изучить значение их взаимодействия.

Одна из целей этой книги приведена в названии. В последующих главах мы попытаемся объяснить поведение и сложные функции мозга в терминах активности нервных клеток. Второй целью является рассмотрение клеточных и молекулярных механизмов межнейронного взаимодействия. Третья цель связана с изучением способов образования структур и связей, которые лежат в основе функций развивающегося организма, как эти функции и связи изменяются с опытом и могут восстановиться после повреждения. В настоящей главе мы суммируем ключевые концепции и основы рассматриваемых явлений.

Взаимосвязи в простых нервных системах

События, которые происходят при реализации простых рефлексов, могут быть прослежены и проанализированы детально. Например, когда по коленной связке ударяют маленьким молоточком, мыщцы и сухожилия бедра растягиваются и электрические импульсы по сенсорным нервным волокнам идут в спинной мозг, в котором возбуждаются моторные клетки, производя импульсы и активируя мышечные сокращения. Конечным результатом является распрямление ноги в коленном суставе. Такие упрощенные схемы очень важны для регулировки мышечных сокращений, управляющих движениями конечностей. В таком простом рефлексе, в котором стимул ведет к определенному выходу, роль сигналов и взаимодействий всего двух видов клеток может быть успещно проанализирована.

Сложные нейронные сети и высшие функции мозга

Анализ взаимодействия нейронов в сложных путях, вовлекающих в буквальном смысле миллионы нейронов, существенно более труден, чем анализ простых рефлексов. Пере-

дача информации в мозг при восприятии звука, прикосновения, запаха или зрительного образа требует последовательного вовлечения нейрона за нейроном, так же как и при выполнении простого произвольного движения. Серьезная проблема при анализе взаимодействия нейронов и структуры сети возникает из-за плотной упаковки нервных клеток, сложности их взаимосвязей и обилия типов клеток. Мозг устроен не так, как печень, которая состоит из одинаковых популяций клеток. Если вы обнаружили, как работает одна область печени, то вы знаете очень много о печени в целом. Знания о мозжечке, однако, ничего не скажут вам о работе сетчатки или любой другой части центральной нервной системы.

Несмотря на огромную сложность нервной системы, сейчас возможно проанализировать много способов взаимодействия нейронов при восприятии. Например, записывая активность нейронов в пути от глаза к мозгу, можно проследить сигналы сначала в клетках, специфически отвечающих на свет, и затем, шаг за шагом, по последовательным переключениям, до высших центров мозга.

Интересной особенностью работы зрительной системы является способность выделять контрастные образы, цвета и движения в огромном диапазоне интенсивностей цвета. Когда вы читаете эту страницу, сигналы внутри глаза обеспечивают возможность для черных букв выделяться на белой странице в слабоосвещенной комнате или при ярком солнечном освещении. Специфические связи в мозге образуют единую картину, несмотря на то, что два глаза расположены раздельно и сканируют отличающиеся области внешнего мира. Более того, существуют механизмы, обеспечивающие постоянство образа (хотя наши глаза непрерывно двигаются) и дающие точную информацию о расстоянии до страницы.

Каким образом связи нервных клеток обеспечивают подобные явления? Несмотря на то, что мы еще не способны дать полное объяснение, сейчас многое известно о том, как эти свойства зрения обеспечиваются простыми нейрональными сетями в глазе и на начальных стадиях переключения в мозге. Конечно, остается много вопросов о том, каковы связи между свойствами нейронов и поведением. Так, для того чтобы прочесть страницу, вы должны сохранять определенное положение тела, головы и рук. Далее, мозг должен обеспечить постоянное увлажнение глазного яблока, постоянство дыхания и многие другие непроизвольные и неподконтрольные сознанию функции. Подобные проблемы, предусматривающие описание целостной картины координированных движений тела, выходят за рамки этой книги.

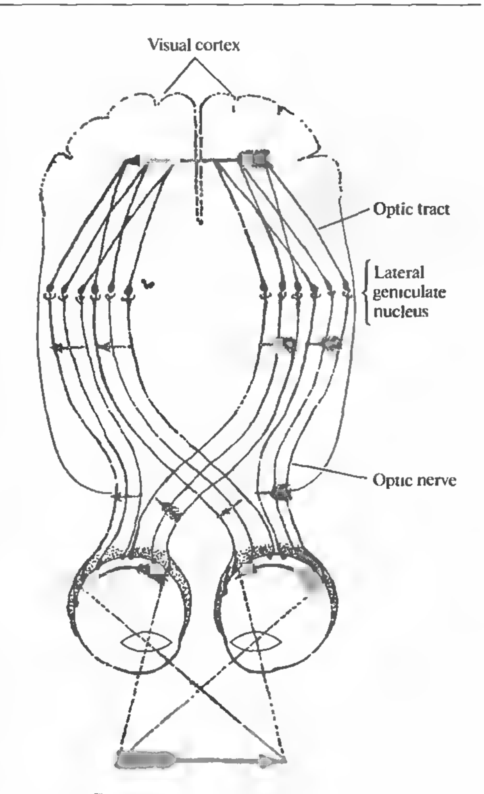


Рис. 1.1. Пути от глаза до мозга через оптический нерв и оптический тракт.

Fig. 1.1. Pathways from the Eyes to the Brain through the optic nerve and the optic tract. The interposed relay is the lateral geniculate nucleus. Arrows indicate how images are reversed by the lens and how the specific crossing of axons causes the right visual field to be represented in the left brain, and vice versa. The figure has been modified from an original by Ramó y Cajal, which dates from 1892 ([1909–1911] Eng. trans. 1995).

В дальнейшем мы рассмотрим принципы организации нервной клетки, возникновения и распространения электрических сигналов от нейрона к нейрону. Функционирование сетчатки является хорошим примером основных принципов работы нервной системы.

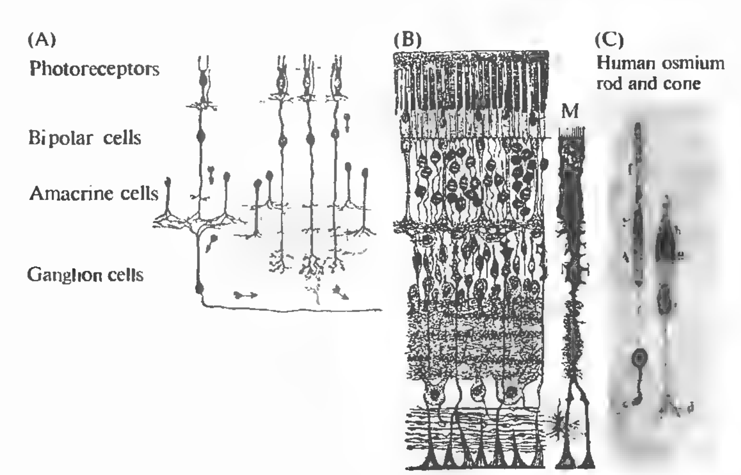


Рис. 1.2. Структура и связи клеток в сетчатке млекопитающих. (A) Схема направления сигнала от рецептора к оптическому нерву по Рамон-и-Кахалю. (B) Распределение по Рамон-и-Кахалю клеточных элементов сетчатки. (C) Рисунки палочки и колбочки сетчатки человека.

Fig. 1.2. Structure and Connections of Cells in the Mammalian Retina. The photoreceptors (rods and cones) connect to bipolar cells. Bipolar cells in turn connect to ganglion cells, whose axons constitute the optic nerve. Horizontal cells (not shown) and amacrine cells make connections that are predominantly horizontal. (A) The scheme proposed by Ramón y Cajal for the direction taken by signals as they pass from receptors to the optic nerve fibers. This scheme still holds in general, but essential new pathways and feedback groups have been discovered since Ramón y Cajal's time. (B) Ramón y Cajal's depiction of the cellular elements of the retina and their orderly arrangement. The Mueller cell (M) shown on the right is a satellite glial cell. (C) Drawings of a human rod (left) and cone (right) isolated from the retina. Light passes through the retina (in these drawings from bottom to top) to be absorbed by the outer segment (top) of the photoreceptor. There it produces a signal that spreads to the terminal to influence the next cell in line. By recording electrically from each cell in the retinal circuit, we can follow signals step by step and understand how the meaning of the signals changes. (After Ramón y Cajal, 1995.)

§ 1. Строение сетчатки

Анализ зрительного мира зависит от информации, поступающей от сетчатки, где происходит первая стадия обработки, устанавливающая пределы для нашего восприятия. На рис. 1.1 показаны пути от глаза до высших центров мозга. Изображение, попадающее на сетчатку, перевернуто, но во всех других аспектах представляет собой добросовестное представление о внешнем мире. Каким образом эта картинка может быть передана в наш мозг посредством электрических сигналов, которые возникают в сетчатке и затем путешествуют по оптическим нервам?

Образы и связи нейронов

На рис. 1.2 показаны разные типы клеток и их расположение в сетчатке. Свет, попадающий в глаз, проходит сквозь слои прозрачных клеток и достигает фоторецепторов. Сигналы, передаваемые из глаза по волокнам оптического нерва, являются единственными информационными сигналами, на которых основано наше зрение.

Схема прохождения информации по сетчатке (рис. 1.2A) была предложена Сантьяго Рамон-и-Кахалем[1)] в конце XIX века. Он был одним из величайших исследователей нервной системы и проводил эксперименты на самых разных животных. Он сделал существенное обобщение о том, что форма и расположение нейронов, так же как область возникновения и конечная мишень нейрональных сигналов в сети, дают важнейшую информацию об функционировании нервной системы.

На рис. 1.2 ясно видно, что клетки в сетчатке, как и в других частях центральной нервной системы (ЦНС), очень плотно упакованы. Вначале морфологам приходилось разрывать нервную ткань на части, чтобы увидеть отдельные нервные клетки. Методы, при которых окрашивают все нейроны, практически бесполезны для исследования формы и связи клеток, потому что такие структуры, как сетчатка, выглядят подобно темному пятну переплетенных клеток и отростков. Электронная микрофотография на рис. 1.3 показывает, что экстраклеточное пространство вокруг нейронов и поддерживающих клеток составляет всего 25 нанометров в ширину. Большая часть рисунков Рамон-и-Кахаля была сделана с помощью метода окраски по Гольджи, ко-

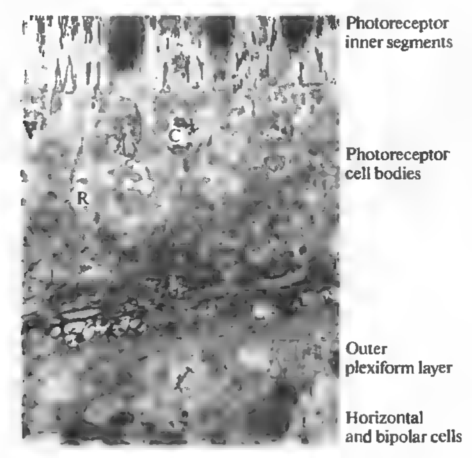


Рис. 1.3. Плотная упаковка нейронов в сетчатке обезьяны. Помечена одна палочка (R) и одна колбочка (C).

Fig. 1.3. Dense Packing of Neurons in Monkey (Macaque) Retina. This electron micrograph shows a characteristic feature of the central nervous system: The cell membranes are separated by narrow, fluid-filled clefts. The photoreceptors and their processes can be followed to the outer plexiform layer where their terminals contact bipolar and horizontal cells. One cone (C) and one rod (R) are labeled. (Micrograph kindly provided by P. Sterling and Y. Tsukamoto.)

торый окрашивает с помощью неизвестного механизма всего несколько случайных нейронов из всей популяции, но эти несколько нейронов окрашены полностью.

Схема на рис. 1.2 показывает принцип упорядоченного расположения нейронов в сетчатке. Легко отличить фоторецепторы, биполярные и ганглиозные клетки. Направление передачи идет от входа к выходу, от фоторецепторов к ганглиозным клеткам. Кроме того, два других типа клеток, горизонтальные и амакриновые, образуют связи, соединяющие разные пути. Одной из целей нейробиологии, присутствующей в рисунках Рамон-и-Кахаля, является стремление понять, как каждая клетка участвует в создании картины мира, которую мы наблюдаем.

Тело клетки, дендриты, аксоны

Ганглиозная клетка, показанная на рис. 1.4, иллюстрирует особенности строения нервных клеток, присущие всем нейронам центральной и периферической нервной системы. Клеточное тело содержит ядро и другие внутриклеточные органеллы, общие для всех клеток. Длинный отросток, который покидает тело клетки и образует связь с клеткой-мишенью, называется аксоном. Термины **дендрит, тело клетки** и **аксон** применяются к отросткам, на которых входящие волокна образуют контакты, играющие роль принимающих станций для возбуждения или торможения. Кроме ганглиозной клетки, на рис. 1.4 показаны другие виды нейронов. Термины для описания структуры нейрона, в частности дендритов, несколько спорны, но, тем не менее, они удобны и широко применяются.

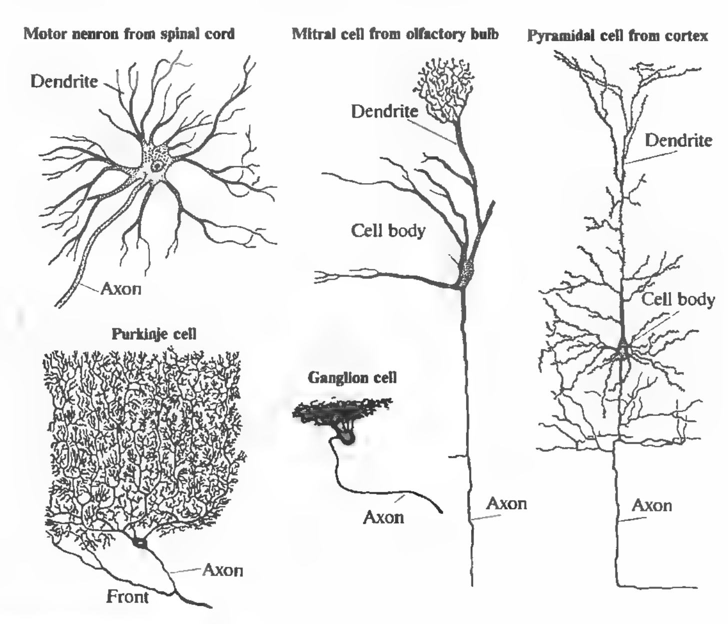
Не все нейроны соответствуют простому строению клетки, показанному на рис. 1.4. У некоторых нейронов нет аксонов; у других есть аксоны, на которых образуется связь. Есть клетки, чьи дендриты могут проводить импульсы и образовывать связи с клетками-мишенями. Если ганглиозная клетка соответствует схеме стандартного нейрона с дендритами, телом и аксоном, то другие клетки не соответствуют этому стандарту. Например, у фоторецепторов (рис. 1.2С) нет очевидных дендритов. Активность фоторецепторов не вызывается другими нейронами, но активируется внешними стимулами, освещением. Другим исключением в сетчатке является отсутствие аксонов у фоторецепторов.

Методы идентификации нейронов и прослеживание их связей

Хотя техника Гольджи все еще широко используется, многие новые подходы облегчили функциональную идентификацию нейронов и синаптических связей. Молекулы, которые окрашивают нейрон полностью, могут быть инъецированы через микропипетку, которая одновременно регистрирует электрический сигнал. Флуоресцентные маркеры, такие как люцифер желтый, позволяют увидеть самые тонкие отростки в живой клетке. Внутриклеточно могут быть введены такие маркеры, как фермент пероксидазы хрена (ПХ) или биоцитин; после фиксации они образуют плотный продукт или ярко светятся в флуоресцентном свете. Нейроны можно окрасить пероксидазой хрена и при экстраклеточной аппликации; фермент захватывается и транспортируется в тело клетки. Флуоресцентные карбоциановые красители при соприкосновении с мембраной нейрона растворяются и диффундируют по всей поверхности клетки. Эти приемы

Рис. 1.4. Формы и размеры нейронов.

Fig. 1.4. Shapes and Sizes of Neurons. Neurons have branches (the dendrites) on which other neurons form synapses, and axons that in turn make connections with other neurons. The motor neuron, drawn by Deiters in 1869, was dissected from a mammalian spinal cord. The other cells, stained by the Golgi method, were drawn by Ramón y Cajal. The pyramidal cell is from the cortex of a mouse, the mitral cell from the olfactory bulb (a relay station in the pathway concerned with smell) of a rat, the Purkinje cell from human cerebellum, and the ganglion cell from mammalian retina (animal not specified). (After Ramón y Cajal, 1995.)



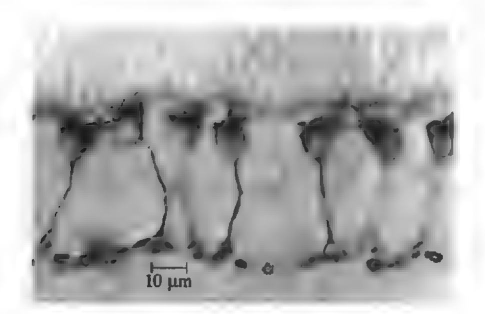


Рис. 1.5. Группа биполярных клеток, окрашенных антителом на фермент фосфокиназа С. Только содержащие фермент клетки окрасились.

Fig. 1.5. Population of Bipolar Cells Stained by an Antibody against the enzyme phosphokinase C. Only bipolar cells that contain the enzyme are stained. Above are photoreceptors; below are ganglion cells. (Photograph kindly provided by H. M. Young and D. I. Vaney, University of Queensland.)

очень важны для прослеживания прохождения аксонов из одной части нервной системы в другую.

Для описания специфических нейронов, дендритов и синапсов путем избирательного маркирования внутриклеточных или мембранных компонентов используют антитела. На рис. 1.5 показана группа специфических биполярных клеток, маркированных антителом к ферменту фосфокиназа С. Антитела успешно применяются для прослеживания миграции и дифференциации нервных клеток в онтогенезе. Дополнительным подходом для описания нейронов является гибридизация *in situ*: специфически меченые зонды маркируют мРНК нейрона, которая кодирует синтез канала, рецептора, передатчика или структурного элемента.

Ненервные элементы мозга

Отчетливо видна клетка, помеченная буквой М на рис. 1.2В, представляющая собой ненервную клетку, находящуюся в сетчатке. Такие клетки известны как **глиальные** клетки. В отличие от нейронов, у них нет аксонов или дендритов и они не связаны напрямую с нервными клетками. Глиальных клеток очень много в нервной системе. Они выполняют много разных функций, связанных с передачей сигнала. Например, аксоны ганглиозных клеток сетчатки, составляющие оптический нерв, проводят импульсы очень быстро, потому что они окружены изолирующей липидной оболочкой, называемой миэлин. Миэлин формируется глиальными клетками, которые оборачиваются вокруг аксонов при онтогенетическом развитии. Глиальные клетки сетчатки известны как мюллеровские клетки.

Группировка клеток в соответствии с функцией

Замечательным свойством сетчатки является расположение клеток в соответствии с функцией (см. рис. 1.2). Клеточные тела фоторецепторов, горизонтальных, биполярных, амакриновых и ганглиозных клеток расположены отчетливыми слоями. Подобная слоистость наблюдается повсеместно в мозге. Например, структура, в которой волокна оптического нерва заканчиваются (латеральное коленчатое тело), состоит из 6 слоёв клеток, которые легко различить даже невооруженным глазом. Во многих областях нервной системы клетки со сходными функциями сгруппированы в отчетливые шарообразные структуры, известные как ядра (не путайте с ядром клетки) или ганглии (не путайте с ганглиозными клетками сетчатки).

Подтипы клеток и функция

Упрошенное представление структуры сетчатки на рис. 1.2 не отражает некоторых свойств сетчатки. Существует несколько отчетливых типов ганглиозных, горизонтальных, биполярных и амакриновых клеток, каждый из которых обладает характерной морфологией, специфичностью медиатора и физиологическими свойствами. Например, фоторецепторы разделяются на два легко различимых класса — палочки и колбочки, — которые выполняют различные функции. Удлиненные палочки исключительно чувствительны к малейшим изменениям в освещении. Когда вы читаете эту страницу, рассеянный свет слишком ярок для палочек, которые функционируют только в слабом свете после длительного периода в темноте. Колбочки отвечают на зрительные стимулы в ярком свете. Более того, колбочки далее подразделяются на подтипы фоторецепторов, чувствительные к красному, зеленому или синему цвету. Амакриновые клетки являются ярким примером клеточного разнообразия: более 20 типов может быть выделено по структурным и физиологическим критериям.

Таким образом, сетчатка иллюстрирует глубочайшие проблемы современной нейробиологии. Неизвестно, для чего нужно столько типов амакриновых клеток и какие разные функции выполняет каждый из этих типов клеток. Отрезвляет сознание того, что функция подавляющего большинства нервных клеток центральной, периферической и висцеральной нервной системы неизвестна. В то же время это неведение подсказывает, что многие основные принципы роботы мозга еще не поняты.

Конвергенция и дивергенция связей

Стрелками на рис. 1.2А показано направление передачи сигнала от рецепторов к ганглиозным клеткам. В реальности картина существенно более сложная. Например, наблюдается сильное уменьшение количества вовлеченных клеток на пути от рецепторов к ганглиозным клеткам. Выходы более чем 100 миллионов рецепторов конвергируют на 1 миллионе ганглиозных клеток, аксоны которых составляют оптический нерв. Таким образом, многие (но не все) ганглиозные клетки получают входы от большого количества фоторецепторов (конвергенция) через вставочные клетки. В свою очередь, одна ганглиозная клетка интенсивно ветвится и оканчивается на многих клетках-мишенях (дивергенция, см. рис. 1.13).

Кроме того, в отличие от упрошенной схемы на рис. 1.2А, стрелки должны показывать в стороны для обозначения взаимодействия между клетками в одном слое (латеральные связи) и даже в противоположные стороны — например, назад от горизонтальных клеток к фоторецепторам (возвратные связи). Такие конвергентные, дивергентные, латеральные и возвратные влияния являются постоянными свойствами большинства нервных путей по всей нервной системе. Таким образом, простая пошаговая обработка сигнала затруднена параллельными и обратными взаимодействиями.

§ 2. Сигналы нервных клеток

Для анализа событий во внешнем мире или внутри нашего тела, для передачи информации от клетки к клетке нейроны используют электрические и химические сигналы. Расстояние передачи сигнала может быть большим: от кончиков пальцев на ногах до спинного мозга. Различные сигналы прекрасно представлены все в той же сетчатке. В то время, когда Рамон-и-Кахаль рисовал стрелки на рис. 1.2А, почти не было информации об этих сигналах, что делает его достижения еще более примечательными.

Ступени переработки информации можно последовательно проследить: свет падает на фоторецепторы и генерирует электрические сигналы, которые воздействуют на биполярные клетки. От биполярных клеток сигналы передаются к ганглиозным клеткам и от них к высшим центрам мозга, которые и осуществляют восприятие внешнего мира. В следующих разделах рассматриваются свойства сигналов и пути переработки информации.

Классы электрических сигналов

Электрические сигналы нервных клеток могут быть разделены на два основных класса. Во-первых, это локальные **градуальные потенциалы** (см. рис. 1.8), которые вызываются такими внешними стимулами, как свет, падающий на фоторецепторы глаза, звуковая волна, деформирующая волосковые клетки уха, или прикосновение, механически смещающее отросток сенсорной клетки в коже. Сходны по характеристикам, но существенно отличаются по происхождению сигналы, генерируемые в синапсах — соединениях между клетками, которые мы обсудим позже. Все эти сигналы градуальны и привязаны к месту возникновения, а их распространение зависит от пассивных характеристик нервных клеток.

Потенциалы действия составляют вторую основную категорию (см. рис. 1.9). Потенциалы действия вызываются локальными градуальными потенциалами. В отличие от локальных потенциалов, они быстро распространяются на большие расстояния — например, от глаза до высших центров по волокнам ганглиозных клеток, составляющих оптический нерв, или от моторных клеток в спинном мозге к мышцам ноги. Второе отличие потенциалов действия состоит в том, что они фиксированы по амплитуде и длительности, как точки в азбуке Морзе. Крайне существенно понимать, что потенциалы действия, путешествующие по волокнам оптического нерва не являются эпифеноменами, присутствующими лишь в наших представлениях о работе мозга. Они являются единственной формой сигнализации, которая снабжает мозг информацией о внешнем мире.

Передача сигнала от сетчатки может быть представлена следующей упрощенной схемой:

Свет
↓
Локальный градуальный сигнал в фоторецепторе
↓
Локальный градуальный сигнал в биполярной клетке
↓
Локальный градуальный сигнал в ганглиозной клетке
↓
Потенциал действия в ганглиозной клетке
↓
Проведение сигнала к высшим центрам.

Универсальность электрических сигналов

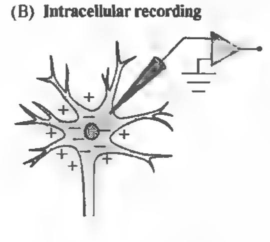
Важным свойством электрических сигналов является то, что они фактически идентичны во всех нервных клетках организма независимо от того, запускают ли они движение, передают ли информацию о цветах, формах или болезненных стимулах, или соединяют различные области мозга. Вторым важным свойством сигналов является то, что они настолько одинаковы у разных животных, что даже умудренный опытом исследователь не способен точно отличить запись потенциала действия от нервного волокна кита, мыши, обезьяны или профессора. В этом смысле потенциалы действия могут считаться стереотипными единицами. Они являются универсальным эталоном для обмена информацией во всех исследованных нервных системах. В мозге не типы сигналов, а огромное количество клеток (от 10^{10} до 10^{12} нейронов) и разнообразие связей обеспечивают сложность выполняемых задач.

Эта идея была высказана в 1868 году немецким физиком и биологом Германом фон Гельмгольцем. Беря за основу гипотетические принципы, задолго до обнаружения известных сейчас фактов, он писал[2)]:

> *Нервные волокна часто сравнивают с телеграфными проводами, пересекающими местность, и это сравнение хорошо приспособлено для иллюстрации удивительных и важных особенностей их образа действия. В телеграфной сети везде мы обнаруживаем те же медные или стальные провода, несущие только один вид движения, поток электричества, но вызывающие самые разные результаты на разных станциях в соответствии с дополнительной аппаратурой, с которой провода соединены. На одной станции эффект состоит в звонке колокольчика, на другой сигнал просто передается дальше, на третьей вступает в работу записывающий аппарат. ...Говоря коротко, каждое из... различных действий, вызываемых*

(A) Extracellular recording

(B) Intracellular recording



(C) Whole-cell patch recording

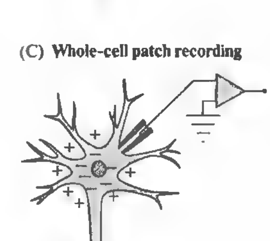


Рис. 1.6. Техника регистрации электрической активности. (А) Кончик тонкого металлического электрода расположен близко к нервной клетке в коре. (В) Внутриклеточная регистрация производится заполненной проводящей жидкостью стеклянной микропипеткой, введенной в клетку. (С) Внутриклеточное отведение также делается пэтч-пипеткой, которая прилипает к клеточной мембране.

Fig. 1.6. Electrical Recording Techniques. (A) The tip of a fine wire electrode is located close to a nerve cell in the cortex. (The wire above the tip is insulated.) Extracellular recording allows one to record from a single cell or from a group of cells. (B) Intracellular recordings are made with a fluid-filled glass capillary that has a tip of less than 1 μm in diameter, which is inserted into a neuron across the cell membrane. At rest, there is a potential difference of about 70 mV, the inside negative with respect to the outside. This difference is known as the resting potential. (C) Intracellular recordings are also made with patch electrodes. A patch electrode has a larger tip than that of an intracellular microelectrode; the tip makes an extremely tight seal with the cell membrane. If the seal is intact, the currents that flow as a single ion channel in the membrane opens or closes can be recorded. Alternatively, as shown here, the cell membrane can be ruptured to allow the diffusion of molecules between the pipette and the intracellular fluid of the cell (whole-cell patch clamp).

электричеством, может быть вызвано и передано проводом в любую необходимую точку. При этом в проводе происходит один и тот же процесс, приводящий к самым разным последствиям. ...Та разница, которую мы видим при возбуждении различных нервов, заключается только в рознице самих органов, к которым присоединен нерв и которым передается состояние возбуждения.

На самом деле, как будет показано в главе 6, небольшая разница в амплитуде и длительности очевидна в потенциалах действия разных нейронов. Утверждение, что все потенциалы действия одинаковы, равносильно утверждению, что все дубы одинаковы.

Техника записи сигналов от нейронов с помощью электродов

Для решения некоторых задач существенно регистрировать активность одного нейрона или даже одного ионного канала, тогда как для других задач необходима суммарная активность многих нейронов. Ниже коротко суммируются основные приемы для записи активности нейронов, используемые для обсуждения в следующих главах.

Впервые запись потенциалов действия от нерва была сделана от периферических нервов экстраклеточными электродами. Пропускание тока между парой серебряных проводников вызывало потенциал действия, тогда как вторая пара таких же электродов на некотором расстоянии регистрировала ответ. В центральной нервной системе регистрация от нейрона или группы нейронов производится экстраклеточным электродом, который состоит из проводника в изолирующей оболочке или из стеклянного капилляра, заполненного проводящим солевым раствором (рис. 1.6А).

С помощью внутриклеточного микроэлектрода мы можем прямо измерять разницу потенциала между наружней и внутренней средой клетки, так же как возбуждение, торможение и возникновение импульсов. Стеклянный микроэлектрод, заполненный солевым раствором и с кончиком менее 0,1 мм в диаметре, вводится в клетку с помощью микроманипулятора (рис. 1.6В). Микроэлектроды также используют для пропускания тока через мембрану или внутриклеточной инъекции молекул в цитоплазму.

Часто используется прием измерения мембранного потенциала, известный как пэтч-кламп целой клетки. Стеклянная пипетка со сравнительно большим полированным кончиком придвигается к поверхности клетки, где она прилипает к мембране и образует прочное соединение. После нарущения целостности мембраны внутри пипетки жидкость в пипетке прямо контактирует с внутриклеточной жидкостью.

Неинвазивные методы регистрации нейронной активности

Используя метод оптической регистрации, можно проследить передачу информации в некоторых препаратах мозга без использования электродов. Специально созданные красители, которые связываются с клеточной мембраной, изменяют абсорбцию проходящего света или флуоресценцию при изменениях мембранного потенциала клетки, что можно объективно регистрировать. Существуют и такие неинвазивные методы, как позитронно-эмиссионная томография и магнитно-резонансная томография (МРТ), которые позволяют определить, какие области мозга бодрствующего человека активизируются при предъявлении стимулов или при движении. Получаемое с помощью МРТ изображение на рис. 1.7 показывает области, активируемые при предъявлении зрительного стимула.

Ретинограмма отражает суммарную активность сетчатки, электроэнцефалограмма — суммарную активность мозга. Эти методы в основном используются для диагностики нарушений функций мозга.

Распределение локальных градуальных потенциалов и пассивные электрические свойства нейронов

В схемах Рамона-и-Кахаля, отображающих клеточное строение мозга (см. рис. 1.2А), просвечивает идея о том, что освещение сетчатки изменяет активность фоторецепторов и эти изменения отражаются в активности нервных волокон, выходящих из глаза. Для такой передачи информации сигналы должны распространяться не только от клетки к клетке, но и вдоль клетки, от одного ее конца до другого. Как, например, электрический сигнал, генерируемый на контактирующем с фоторецептором конце биполярной клетки, распространяется вдоль нейрона и достигает терминали, которая расположена около ганглиозной клетки?

Для того чтобы ответить на этот вопрос, полезно рассмотреть соответствующие структуры, которые передают сигналы. Биполярную клетку можно рассматривать как длинный цилиндр, наполненный водным раствором солей (диссоциированных на положительно и отрицательно заряженные ионы) и белков, отделенный от экстраклеточного раствора мембраной. Внутриклеточный и экстраклеточный растворы осмотически одинаковы, но имеют разный ионный состав. Ионы двигаются по специальным **ионным каналам**, которые образованы белковыми молекулами, пронизывающими мембрану. Электрические и химические стимулы вызывают открытие или закрытие каналов для ионов кальция, натрия, калия и хлора.

В результате различий в концентрации ионов по обе стороны мембраны и из-за избирательности каналов для определенных ионов образуется **потенциал покоя** клетки. В покое внутреннее содержимое клетки отрицательно заряжено по отношению к наружной среде (см. рис. 1.6). Детальная информация о молекулярной структуре ионных каналов и принципов прохождения через них ионов дана в главе 2.

Строение и свойства нейрона определяют способность проведения электрических сигналов. Во-первых, внутриклеточная жидкость, цитоплазма (аксоплазма в отростке клетки, аксоне) примерно в 10^7 раз хуже проводит электричество, чем металлический проводник. Одной из причин является то, что плотность переносчиков заряда, ионов, в несколько раз меньше, чем электронов в металле; кроме того, подвижность ионов невелика. Во-вторых, протекание тока вдоль аксона на большое расстояние осложняется тем, что мембрана не является идеальным изолятором. Соответственно, величина тока, текущего вдоль волокна, быстро уменьшается из-за утечки через ионные каналы мембраны. Тот факт, что нервные волокна очень малы (обычно не более 20 микрон (мкм) в диаметре у позвоночных), еще больше уменьшает количество проводимого тока. Алан Ходжкин дал интересную иллюстрацию этих свойств распространения электрического сигнала[3]:

> *Если специалист по электричеству посмотрит на нервную систему, то сразу увидит, что передача сигнала по нервным волокнам является огромной проблемой. Диаметр аксона в нерве*

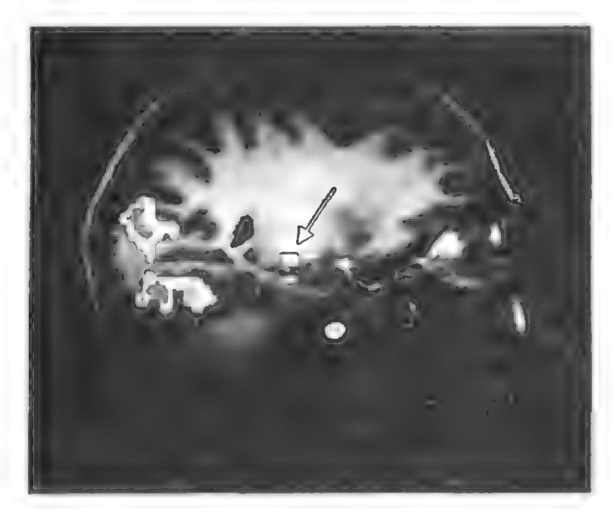


Рис. 1.7. Изображение живого мозга с помощью МРТ.

Fig. 1.7. Magnetic Resonance Imaging of Living Brain. The subject was presented with visual stimuli that caused activity to be generated in the lateral geniculate nucleus (labeled with the bounded arrow) deep within the brain (see Figure 1.1 and Chapter 20) and the visual cortex. The color represents the level of activity, white corresponding to high and grey to low. (After Ugurbil et al., 1999; image kindly provided by K. Uğurbil.)

варьирует от 0,1 до 20 микрон. Внутреннее содержимое содержит ионы и является неплохим проводником электричества. Однако, волокно невелико и его продольное сопротивление очень высоко. Простой расчет показывает, что в волокне диаметром 1 микрон и сопротивлением 100 Ом/см удельное сопротивление составит около 10^{10} Ом/см. Это означает, что электрическое сопротивление маленького нервного волокна длиной в 1 метр равно сопротивлению 10^{10} миль 0,2 мм медной проволоки, то есть проволоки длиной в десять раз больше, чем от Земли до планеты Сатурн.

Таким образом, пассивное проведение электрических сигналов затруднено и ограничено расстоянием 1–2 мм. Кроме того, когда такой сигнал короток, его форма может быть сильно искажена и его амплитуда еще уменьшена емкостью клеточной мембраны. Тем не менее, локальные потенциалы очень важны для вызова и проведения распространяющегося сигнала.

Распространение изменений потенциала в биполярных клетках и фоторецепторах

Фоторецепторы и биполярные клетки невелики по длине, поэтому локальный градуальный сигнал может эффективно распространяться от одного конца клетки до другого. Электрический сигнал, который отражает попадание света на фоторецептор, генерируется в наружном сегменте палочек или колбочек. Оттуда сигнал пассивно распространяется вдоль клетки до терминали на биполярной клетке. Если бы рецептор или биполярная клетка были длиннее (несколько миллиметров в длину), то локальный потенциал из-за сильного ослабления не достиг бы терминали и не смог влиять на следующую в цепи клетку. Биполярные клетки и фоторецепторы представляют собой исключение из общего правила, которое гласит, что для переноса информации вдоль нейрона необходимы потенциалы действия. Ганглиозные клетки обладают длинным (несколько сантиметров) аксоном и поэтому должны генерировать потенциалы действия для эффективного распространения сигнала в оптический нерв. Записи активности, показанные на рис. 1.8, сделаны от тел клеток. Локальные потенциалы возникают на дендритах в результате синаптических воздействий и пассивно распространяются к месту отведения.

Свойства потенциалов действия

Одним из основных свойств потенциала действия является то, что это взрывное, пороговое событие, возникающее по закону «все-или-ничего». Потенциал действия возникает в ганглиозной клетке в тех случаях, когда приходящие от биполярных и амакриновых клеток сигналы достигают некоторого критического уровня (**порога**) мембранного потенциала. У потенциала действия (ПД) есть четко определенный порог, после достижения которого амплитуда и длительность ПД не зависят от параметров стимуляции. Большие по амплитуде стимулы не вызывают большие по амплитуде ПД, равно как и длинные стимулы не приводят к появлению более длинных ПД.

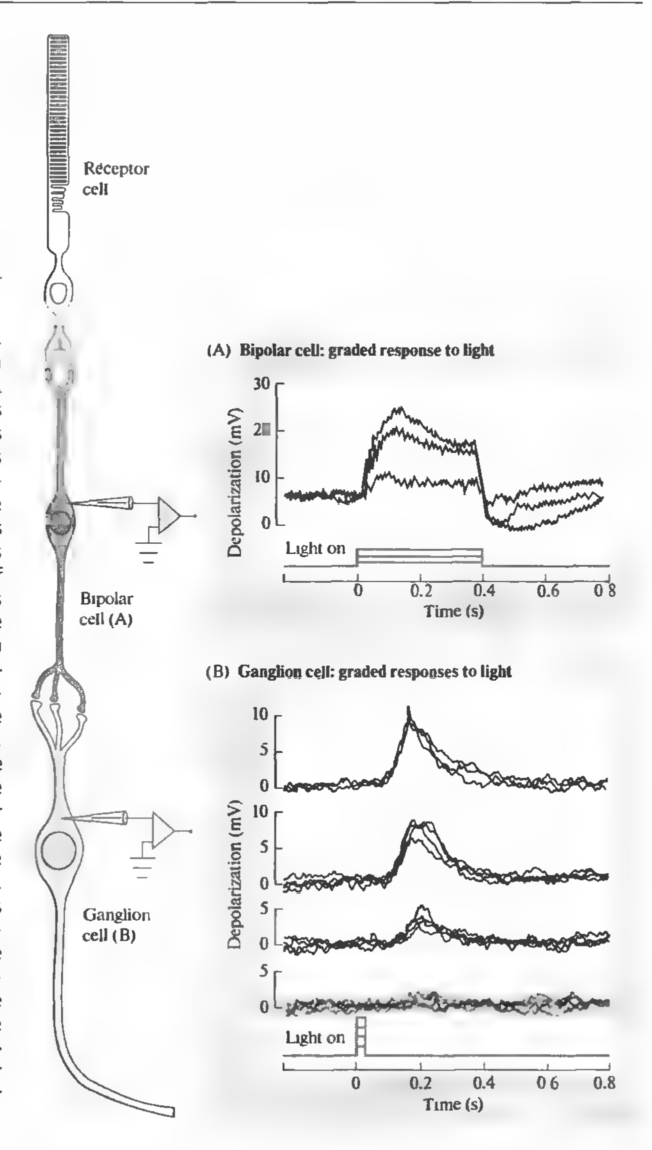


Рис. 1.8. Локальные градуальные потенциалы.

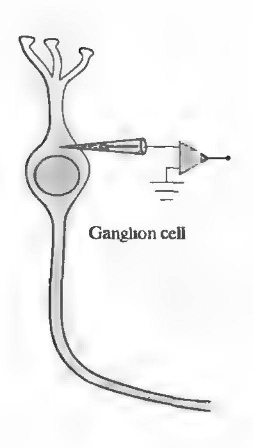
Fig. 1.8. Localized Graded Potentials. Intracellular recordings are made from (A) a bipolar cell and (B) a ganglion cell with microelectrodes. (A) When light is absorbed by the photoreceptors, it gives rise to a signal that in turn produces a localized graded response in the bipolar cell. The resting potential across the membrane is reduced (the trace moves in an upward direction). This effect is known as a depolarization. The size of the signal in the bipolar cell depends on the intensity of illumination, hence the term "graded". The depolarization spreads to the far end of the bipolar cell passively. As it spreads, it becomes smaller in amplitude owing to the poor conducting properties of neurons. At the terminal of the bipolar cell, the depolarization causes the release of the chemical transmitter. (B) The transmitter produces a local graded potential in the ganglion cell. Because it is localized, the potential cannot spread for more than 1 mm (at most) along the axon. Whereas the bipolar cell is short enough for a local potential to spread to its endings, the ganglion cell has an axon several centimeters long. In these illustrations the local potentials were recorded from the cell bodies and were produced by transmitters acting on the dendrites. (A after Kaneko and Hashimoto, 1969; B after Baylor and Fettiplace, 1977.)

На рис. 1.9 показано, что ПД представляет собой короткий электрический импульс амплитудой около 0,1 В. Длительность ПД около 1 миллисекунды (мс), и он быстро движется вдоль нервного волокна от одного конца к другому.

Все фазы ПД должны быть полностью закончены до начала возникновения следующего ПД. После каждого ПД существует период вынужденного молчания (**рефрактерный период**), во время которого инициация ПД невозможна. Частота ритмических ПД определяется рефрактерным периодом.

Распространение ПД вдоль нервных волокон

Каждый импульс вызывает электрические токи, распространяющиеся пассивно перед ним по аксону. Хотя результирующий локальный потенциал быстро угасает с расстоянием, он все же превышает порог. Таким образом, ПД производит электрический стимул области ак-



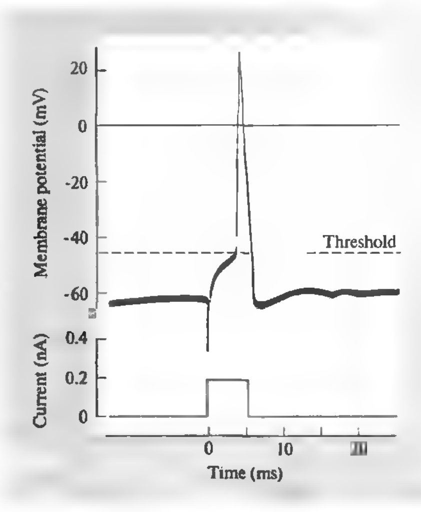


Рис. 1.9. Регистрация потенциала действия ганглиозной клетки сетчатки внутриклеточным микроэлектродом.

Fig. 1.9. Action Potential recorded from a retinal ganglion cell with an intracellular microelectrode. When the stimulus, in this case current injected into the cell through the microelectrode, causes a depolarizing response that exceeds the threshold, the all-or-nothing action potential is initiated. During the action potential the inside of the neuron becomes positive. The action potential propagates along the axon of the ganglion cell to its terminal, where it causes transmitter to be released. (After Baylor and Fettiplace, 1977.)

сона, в которую будет распространяться. Наиболее быстрые ПД распространяются по волокнам большого диаметра со скоростью около 120 метров в секунду (430 км/час), что и определяет возможность быстрой передачи информации на большие по сравнению с размером тела клетки расстояния.

ПД как нейронный код

Учитывая, что каждый ПД имеет фиксированную амплитуду, неясно, в чем же отражается величина стимула. Интенсивность кодируется частотой ПД. Более эффективный зрительный стимул вызывает большую деполяризацию и, как следствие, более высокую частоту генерации ПД в ганглиозной клетке (рис. 1.10). Такое обобщение впервые было сделано Е. Эдрианом[4], который показал, что частота ПД в чувствительном окончании кожного нерва зависит от интенсивности стимула. Кроме того, он обнаружил, что более сильный стимул активирует большее количество чувствительных волокон.

Синапсы: области межклеточной коммуникации

Фоторецепторы влияют на биполярные клетки, которые влияют на гангионарные клетки и так далее, что в конечном счете приводит к восприятию зрительного образа. Структура, через которую одна клетка передает информацию другой, известна как **синапс**. Механизм синаптической передачи представляет собой основную тему исследований в современной нейробиологии. Через синаптические взаимодействия нейроны, подобные ганглиозной клетке, интегрируют информацию о сигналах во многих фоторецепторах, производя на выходе новый собственный информационный сигнал для нервной сети.

Химически опосредованная синаптическая передача

На рис. 1.11 показана сложно организованная структура, с помощью которой фоторецептор контактирует с биполярными клетками. Пресинаптическая терминаль фоторецептора отделена от биполярной клетки щелью, заполненной экстраклеточной жидкостью. Это пространство слишком велико для прохождения токов, генерируемых фоторецептором. Вместо этого терминаль фоторецептора выделяет **медиатор** (иначе, трансмиттер или нейропередатчик), который хранится в пресинаптических пузырьках. Медиатор (в данном случае глутамат) диффундирует через синаптическую щель и реагирует со специфическими молекулами белка (**рецепторами**), которые находятся в **постсинаптической** мембране биполярной

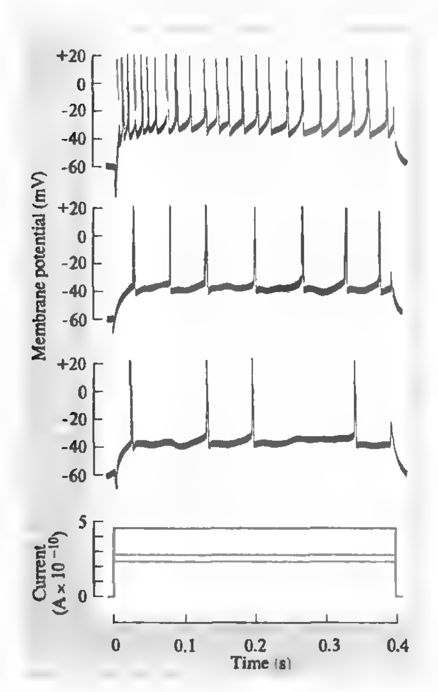


Рис. 1.10. Частота как показатель интенсивности сигнала в ганглиозной клетке сетчатки.

Fig. 1.10. Frequency as a Signal of Intensity in a retinal ganglion cell. Depolarizing current passed through the microelectrode produces local potentials. Larger currents produce larger local potentials and higher frequencies of firing. (After Baylor and Fettiplace, 1979.)

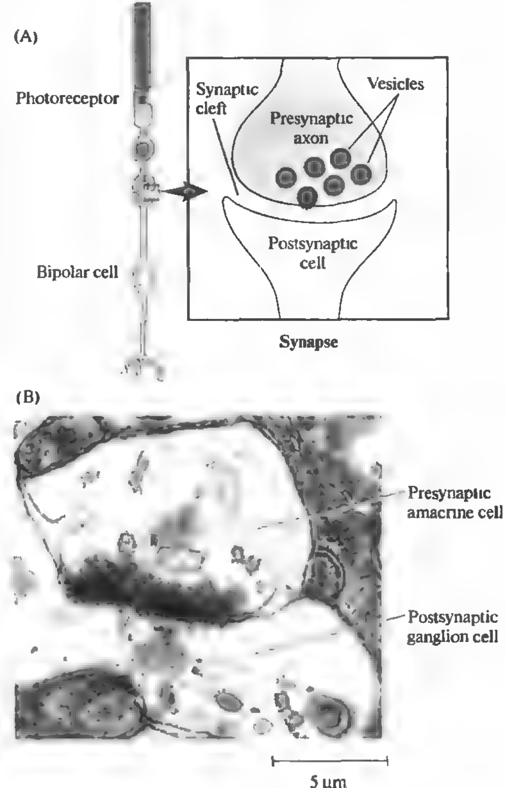


Рис. 1.11. Структура синапса. (A) Основные свойства синапса между фоторецептором и биполярной клеткой. (B) Электронная микрофотография типичного синапса в сетчатке обезьяны.

Fig. 1.11. Structure of a Synapse. (A) These drawings show the principal features of synaptic structures made by a photoreceptor on a bipolar cell. (B) This electron micrograph shows the appearance of a typical synapse in the retina of a macaque monkey. The vesicles that store transmitter are in the presynaptic terminal; a narrow cleft separates the pre- and postsynaptic membranes. The postsynaptic membrane is densely stained. Transmitter released from the presynaptic amacrine cell diffuses across the cleft to interact with receptors on the postsynaptic ganglion cell. (Micrograph kindly provided by Y. Tsukamoto and P. Sterling.)

клетки. Следует отличать «хеморецепторы», реагирующие на молекулы, и «сенсорные рецепторы», реагирующие на внешние стимулы, например, фоторецептор. Медиаторы, синтезируемые и выделяемые нейроном, и рецепторы мембраны могут быть идентифицированы и визуализованы некоторыми методиками, включающими мечение антителами.

Активация молекул рецепторов биполярной клетки глутаматом приводит к появлению градуального локального потенциала, который распространяется по нейрону. Чем больше медиатора выделяется, тем выше его концентрация в щели, тем больше рецепторов активируется и тем больше локальный потенциал. Все эти события происходят быстро, примерно за 1 мс. Основные принципы синаптической передачи были впервые описаны Катцом, Куффлером и соавторами[5], которые использовали ответы мышечных рецепторов как очень чувствительную биомодель с хорошим разрешением по времени для измерения выделения медиатора.

Возбуждение и торможение

Особенностью синаптической передачи, продемонстрированной на примере взаимодействия между фоторецептором и биполярной клеткой, является возможность торможения

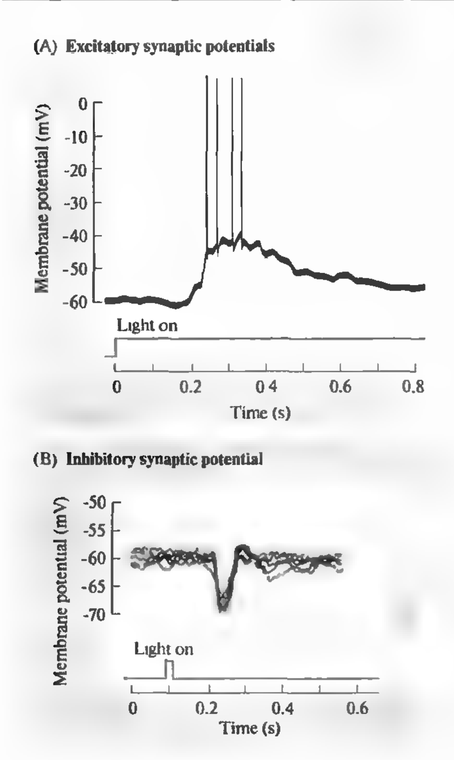


Рис. 1.12. Возбуждение и торможение. (А) Возбуждение ганглиозной клетки при освещении сетчатки. (В) Освещение другой группы фоторецепторов вызывает торможение, выражающееся в гиперполяризации и отдалении от порога генерации потенциала действия.

Fig. 1.12. Excitation and Inhibition. Intracellular recordings from a ganglion cell showing excitatory and inhibitory synaptic potentials. (A) A ganglion cell is depolarized by continuous release of excitatory transmitter during retinal illumination. If the depolarizing synaptic potential is large enough, threshold is crossed and action potentials are initiated in the ganglion cell. (B) Illumination of a different group of photoreceptors causes inhibition. Hyperpolarization of the membrane makes it more difficult to initiate an action potential. (After Baylor and Fettiplace, 1979.)

или возбуждения в зависимости от набора рецепторов в постсинаптической клетке. Например, один из видов глутаматных рецепторов на биполярной клетке реагирует на глутамат возбуждением (деполяризацией), которое распространяется до терминалей на другом конце клетки и приводит к высвобождению медиатора. Другой класс биполярных клеток содержит глутаматные рецепторы другого вида, которые реагируют торможением. В этом случае события происходят в той же последовательности, но приводят к уменьшению выброса медиатора. Примеры возбудительных и тормозных потенциалов в ганглиозной клетке показаны на рис. 1.12.

Во всех нейронах нервной системы соотношение возбудительных и тормозных входов определяет возможность достижения порога инициации потенциала действия. Например, ганглиозная клетка получает и возбудительные, и тормозные входы. Если порог преодолен, то новый сигнал в виде ПД будет послан к высшим центрам, если нет, то сигнала не будет. В моторных клетках спинного мозга, например, возбудительные и тормозные влияния от разных волокон определяют, будет или нет произведено движение, контролируемое данными мотонейронами. Подобные мотонейроны получают около 10 000 входов от волокон (рис. 1.13А). Эти волокна выделяют медиаторы, которые приближают или отдаляют от порога возникновения ПД мембранный потенциал. Отдельные клетки в мозжечке получают более чем 100 000 входов.

Электрическая передача

Хотя основной способ передачи информации осуществляется через химическую передачу, некоторые клетки в сетчатке и других областях нервной системы связаны специализированными соединениями, в которых происходит **электрическая** передача информации. Пре- и постсинаптические мембраны в таких соединениях близко расположены и связаны каналами, которые соединяют внутриклеточное содержимое двух клеток. Такое соединение позволяет локальным потенциалам и даже потенциалам действия прямо распространяться от клетки к клетке без химического передатчика. Продукты метаболизма и красители также могут распространяться от клетки к клетке. В сетчатке есть так называемые горизонтальные клетки, которые электрически связаны таким способом. Благодаря этому свойству градуальные потенциалы могут распространяться от одной к другой горизонтальной клетке, сильно влияя на процесс переработки зрительной информации в сетчатке. Электрические синапсы обнаружены и между другими клетками тела, например между эпителиальными клетками, мышечными волокнами кишечника и сердца.

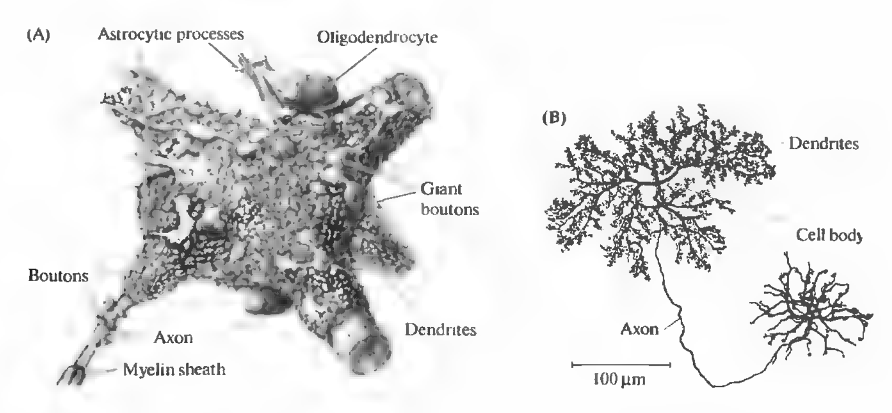


Рис. 1.13. Множественные связи отдельных нейронов. (А) Примерно 10 000 пресинаптических аксонов конвергируют и образуют синаптические окончания на поверхности мотонейрона спинного мозга. (В) Дивергенция аксона одной горизонтальной клетки.

Fig. 1.13. Multiple Connections of Individual Neurons. (A) Approximately 10 000 presynaptic axons converge to form endings that are distributed over the surface of a motor neuron in the spinal cord. This drawing is based on a reconstruction made from electron micrographs. (B) This drawing shows the divergence of the axon of a single horizontal cell that branches extensively to supply many postsynaptic target cells. (A from Poritsky, 1969; B after Fisher and Boycott, 1974.)

Модуляция синаптической эффективности

Химически опосредованная синаптическая передача информации очень лабильна. Основные изменения происходят в количестве медиатора, выделяемого при достижении пресинаптической терминали потенциалом действия или градуальным потенциалом. Фоторецептор сетчатки может служить примером: количество медиатора глутамата, выделяемого палочкой или колбочкой в ответ на стандартный световой стимул, может быть увеличено или уменьшено в зависимости от обратной связи на терминаль от горизонтальных клеток, которые получают входы от фоторецепторов. Эта цепь обратной связи играет критическую роль в адаптации глаза к различным уровням освещения.

Другие механизмы, влияющие на величину выброса медиатора, зависят от предыстории импульсной активности. Во время или после залпа импульсов в нейроне количество выделяемого им медиатора может существенно увеличиваться или уменьшаться в зависимости от частоты и длительности предшествующей импульсной активности. Модуляция эффективности может происходить и в постсинапсе. Долговременная и кратковременная пластичность находится в фокусе внимания нейробиологов.

Интегративные механизмы

Каждый нейрон в центральной нервной системе учитывает все приходящие влияния и на их основе создает свое импульсное «послание» с новым значением. Термин **интеграция** впервые был применен Ч. Шеррингтоном[6], который также ввел в обиход термин «синапс».

Ганглиозные клетки сетчатки опять же могут служить примером способности к интеграции. С. Куффлер[7] впервые показал, что ганглиозные клетки отвечают наиболее сильно на небольшое световое или темновое пятно размером в несколько рецепторов в определенной области сетчатки. Такое пятно вызывает отчетливый залп потенциалов действия (рис. 1.14А). Большое пятно, освещающее ту же область сетчатки, менее эффективно. Это происходит потому, что другая группа фоторецепторов, расположенная вокруг активированных, также реагирует на свет. Действие этих фоторецепторов тормозит активность ганглиозных клеток (рис. 1.14В). Суммация возбуждающего действия маленького пятна и тормозный эффект расположенных вокруг рецепторов приводят к тому, что ганглиозные клетки относительно слабо чувствительны к диффузному свету (рис. 1.14С).

Таким образом, значение сигнала ганглиозной клетки не просто отражает «свет» или «темноту», но и соотносится с паттерном кон-

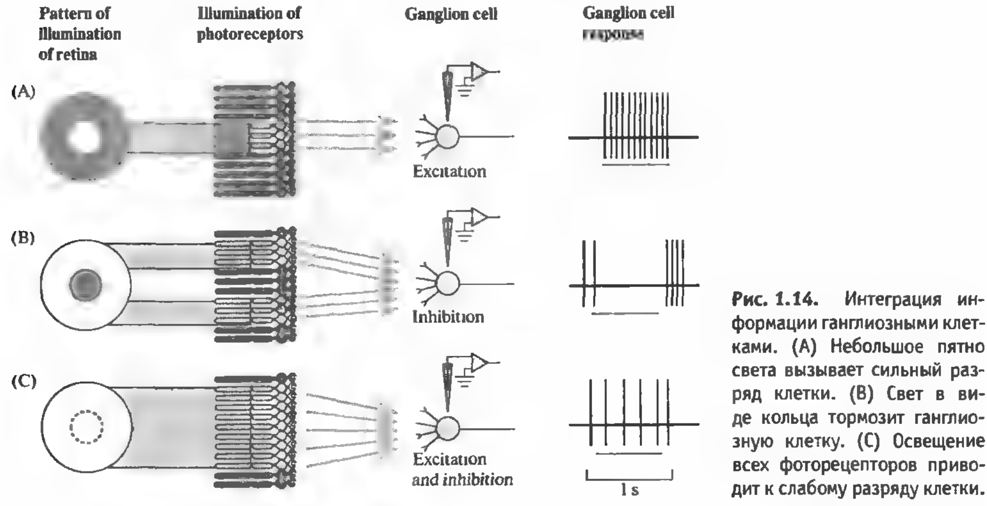


Рис. 1.14. Интеграция информации ганглиозными клетками. (A) Небольшое пятно света вызывает сильный разряд клетки. (B) Свет в виде кольца тормозит ганглиозную клетку. (C) Освещение всех фоторецепторов приводит к слабому разряду клетки.

Fig. 1.14. Integration by Ganglion Cells. Extracellular recordings made from a single ganglion cell in the retina of a lightly anesthetized cat while patterns of light were presented to the eye (see Figure 1.15). (A) A small spot of light presented to a centrally located group of photoreceptors gives rise to excitation and a brisk discharge of action potentials. (B) Light presented as a ring, or annulus, to illuminate a circumferential group of photoreceptors gives rise to inhibition of the ganglion cell, which prevents the cell from firing. Removal of the inhibition at the end of illumination is equivalent to excitation, which gives rise to a burst of action potentials. (C) Illumination of both groups of receptors causes integration of excitation and inhibition and a weak discharge of action potentials. (After Kuffler, 1953.)

трастности светового стимула в поле зрения. Такой сложный сигнал возникает из-за того, что на каждую ганглиозную клетку приходят сигналы от многих фоторецепторов. Специфические связи, опосредованные биполярными, горизонтальными и амакриновыми клетками, определяют специфический паттерн светового стимула, оптимальным образом активирующий каждую конкретную ганглиозную клетку.

Сложность информации, передаваемой потенциалами действия

Еще более сложную информацию о зрительных стимулах несут ПД нервных клеток новой коры, получающих сигнал через три переключения после сетчатки[8)]. Появление ПД в нейронах коры зависит от паттерна освещения сетчатки, который может быть специфичным для разных клеток. Например, один тип клеток избирательно отвечает на полоску света специфической ориентации (вертикальная, горизонтальная или наклонная), которая движется в определенном направлении в определенной части поля зрения (рис. 1.15). Параметры разрядов такой клетки не зависят от диффузного освещения или от появления полоски неоптимальной ориентации, или от движения в неправильном направлении. Таким образом, ПД в таком нейроне дают точную информацию о зрительном стимуле в высшие центры мозга. Подобная детализация значения, передаваемая стереотипными ПД, может быть объяснена точностью образования связей между клетками низкого порядка с кортикальными клетками и способом интеграции входных сигналов (суммация градуальных потенциалов).

Переработка информации может быть представлена в следующем виде:

сигнал фоторецептора несет информацию об изменении интенсивности освещения в данной области поля зрения;

сигнал ганглиозной клетки несет информацию о контрасте;

сигнал кортикального нейрона несет информацию о наличии ориентированной полоски света.

Сложная интеграция информации происходит в других сенсорных системах. Например, направление и локализация механиче-

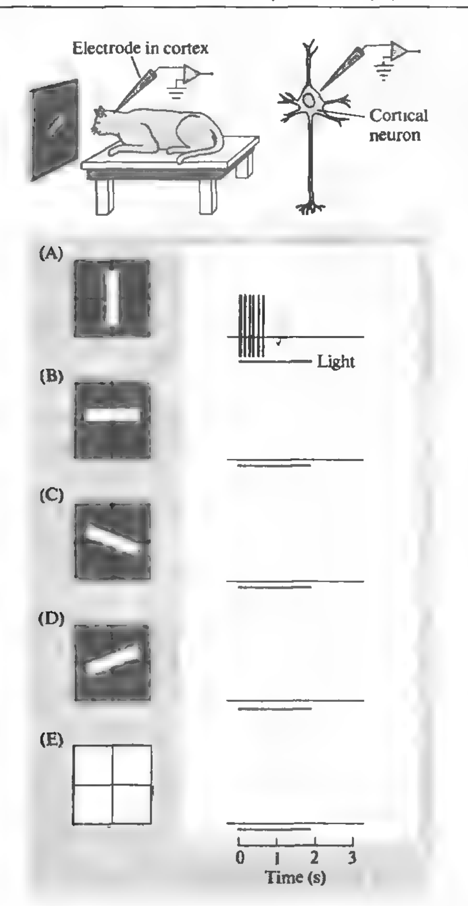


Рис. 1.15. Передача информации потенциалами действия. (А) Ответ клетки зрительной коры кошки на предъявление вертикальной полоски света. (В–Е) Ответы на стимулы другой ориентации.

Fig. 1.15. Information Conveyed by Action Potentials. Extracellular recordings from a neuron in the cerebral cortex of a lightly anesthetized cat. Action potentials in this cell indicate that a bar of light that is almost vertical shines on one particular part of the visual field. The small drawings to the left of the graphs show how visual stimuli such as bars or edges with different orientations and positions are presented to the eye. (A) The cortical cell fires a burst of action potentials when the light stimulus consists of a vertical bar of light in one particular part of the visual field. (B–E) Bars with different orientations or diffuse light fail to evoke action potentials. The cortical cell integrates information arriving by way of relays from a large number of photoreceptors, some of which (corresponding to those illuminated by the vertical bar) give rise to excitation on the cortical cell, the others giving rise to inhibition. (After Hubel and Wiesel, 1959.)

ского стимула кончиков пальцев служат избирательным стимулом для конкретных нейронов той области неокортекса, в которой происходит переработка информации о направлении тактильной стимуляции.

Можно сделать два важных заключения о принципах переработки информации в нервной системе: (1) нервные клетки играют роль составляющих элементов для «построения» восприятия; (2) значение сигнала нейрона может быть очень сложным и зависеть от входных сигналов.

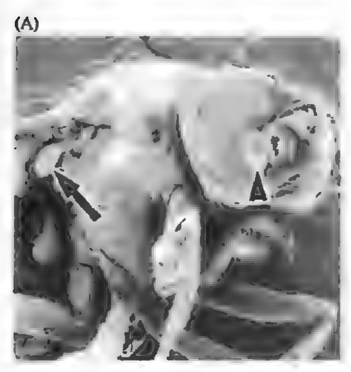
§ 3. Клеточная и молекулярная биология нейронов

Как и другие типы клеток организма, нейроны в полной мере обладают клеточными механизмами метаболической активности, синтеза белков мембраны (например, белков ионных каналов и рецепторов). Более того, белки ионных каналов и рецепторов направленно транспортируются к местам локализации в клеточной мембране. Специфичные для натрия или калия каналы расположены на мембране аксонов ганглиозных клеток дискретными группами (кластерами). Эти каналы участвуют в инициации и проведении ПД.

Пресинаптические терминали, образованные отростками фоторецепторов, биполярных клеток и других нейронов, содержат в своей мембране специфические каналы, через которые могут проходить ионы кальция. Вход кальция запускает выделение медиатора. Каждый тип нейронов синтезирует, хранит и выделяет определенный вид медиатора(ов). В отличие от многих других белков мембраны, рецепторы для специфических медиаторов расположены в точно определенных местах — постсинаптических мембранах. Среди белков мембраны известны также белки-насосы или транспортные белки, роль которых заключается в сохранении постоянства внутреннего содержимого клетки.

Основным отличием нервных клеток от остальных видов клеток организма является наличие длинного аксона. Так как в аксонах нет биохимической «кухни» для синтеза белков, все основные молекулы должны переноситься к терминалям с помощью процесса, называемого **аксональным транспортом,** причем часто на очень большие расстояния. Все молекулы, необходимые для поддержания структуры и функции, равно как и молекулы

(A)



(B)

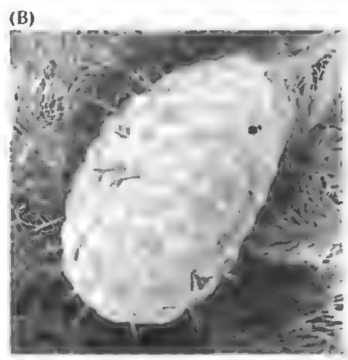


Рис. 1.16. Генетические влияния на развитие глаз у дрозофилы. Ген *eyeless* контролирует развитие глаз у дрозофилы. Повышенная экспрессия гена приводит к появлению морфологически нормальных эктопических глаз (A, B) в разных частях тела мушки.

Fig. 1.16. Genetic Influences on Development of the Eye in the fruit fly, Drosophila. A gene known as *eyeless* controls development of the eye in the fruit fly. After deletion of this gene, eyes fail to appear. Overexpression leads to the development of ectopic eyes that are morphologically normal. (A) This scanning electron micrograph shows such ectopic eyes on the antenna (arrowhead) and on the wing (arrow). (B) Here the wing eye is shown at higher magnification. A gene with strikingly similar sequence homology in the mouse also leads to the formation of ectopic eyes in the fly if it is overexpressed. (After Halder, Callaerts, and Gehring, 1995; micrographs kindly provided by W. Gehring.)

мембранных каналов, путешествуют от тела клетки этим путем. Точно так же и молекулы, захваченные мембраной терминалей, проделывают обратный путь к телу клетки, используя аксональный транспорт.

Нейроны отличаются от большинства клеток еще и тем, что, за небольшим исключением, не могут делиться. Это означает, что у взрослых животных погибшие нейроны не могут быть заменены.

§ 4. Регуляция развития нервной системы

Высокая степень организации такой структуры, как сетчатка, ставит новые проблемы. Если для сборки компьютера необходим человеческий мозг, то никто не контролирует мозг во время развития и установления его связей. Пока еще остается загадкой, как правильная «сборка» частей мозга приводит к появлению его уникальных свойств.

В зрелой сетчатке каждый тип клеток расположен в соответствующем слое или подслое и образует строго определенные связи с соответствующими клетками-мишенями. Такое устройство является необходимым условием правильного функционирования. Например, для развития нормальных ганглиозных клеток клетка-предшественник должна разделиться, мигрировать в определенное место, дифференцироваться в определенную форму и образовать специфические синаптические связи. Аксоны этой клетки должны найти через значительное расстояние (оптический нерв) определенный слой клеток-мишеней в следующем звене синаптического переключения. Аналогичные процессы происходят во всех отделах нервной системы, в результате чего образуются сложные структуры со специфическими функциями.

Исследование механизмов образования таких сложных структур, как сетчатка, является одной из ключевых проблем современной нейробиологии. Понимание того, каким образом сложные взаимосвязи нейронов образуются в процессе индивидуального развития (онтогенезе), может помочь описать свойства и происхождение функциональных расстройств мозга. Некоторые молекулы могут играть ключевую роль в дифференциации, росте, миграции, образовании синапсов и выживании нейронов. Такие молекулы в настоящее время описываются все чаще. Интересно отметить, что электрические сигналы регулируют молекулярные сигналы, которые запускают рост аксонов и образование связей. Активность играет роль в установлении паттерна связей.

Генетические подходы позволяют идентифицировать гены, которые контролируют дифференциацию целых органов, таких как глаз в целом. Геринг[9] с коллегами исследовал экспрессию гена *eyeless* у плодовой мушки *Drosophila*, который контролирует развитие глаз. Удаление этого гена из генома приводит к тому, что глаза не развиваются. Гомоло-

гичные гены у мышей и человека (известные как *small eye* и *aniridia*) похожи по структуре. Если гомологичный ген *eyeless* млекопитающих искусственно встроен и экспрессируется у мушки, то у этого животного развиваются дополнительные (мушиные по структуре) глаза на усиках, крыльях и ногах (рис. 1.16). Это позволяет предположить, что этот ген одинаково управляет образованием глаза у мухи или мыши, несмотря на полностью различные структуру и свойства глаз насекомых и млекопитающих.

§ 5. Регенерация нервной системы после травмы

Нервная система не только устанавливает связи во время развития, но может восстанавливать некоторые связи после повреждения (ваш компьютер этого делать не может). Например, аксоны в руке могут прорастать после повреждения и устанавливать связи; рука опять может двигаться и ощущать прикосновения. Аналогично, у лягушки, рыбы или беспозвоночного животного вслед за разрушениями в нервной системе наблюдается регенерация аксонов и восстановление функции. После перерезки оптического нерва у лягушки или рыбы волокна опять прорастают и животное может видеть. Однако, эта способность не присуща центральной нервной системе взрослых позвоночных животных — у них регенерация не происходит. Молекулярные сигналы, которые блокируют регенерацию, и их биологическое значение для функционирования нервной системы неизвестны.

Выводы

- Нейроны связаны друг с другом строго определенным способом.
- Информация от клетки к клетке передается через синапсы.
- В относительно простых системах, таких как сетчатка глаза, можно проследить все связи и понять значение межклеточных сигналов.
- Нервные клетки мозга являются материальными элементами восприятия.
- Сигналы в нейронах высоко стереотипны и одинаковы для всех животных.
- Потенциалы действия без потерь могут проходить большие расстояния.
- Локальные градуальные потенциалы зависят от пассивных электрических свойств нейронов и распространяются только на короткие расстояния.
- Особое строение нервных клеток требует специализированного механизма аксонального транспорта белков и органелл от и к телу клетки.
- Во время индивидуального развития нейроны мигрируют к окончательному месторасположению и устанавливают связи с мишенями.
- Молекулярные сигналы управляют ростом аксонов.

Цитированная литература

1. Ramón y Cajal, S. [1909–1911] 1995. *Histology of the Nervous System*, 2 vols. Translated by Neely Swanson and Larry Swanson. Oxford University Press, New York.
2. Helmholtz, H. von. 1889. *Popular Scientific Lectures*. Longmans, London.
3. Hodgkin, A. L. 1964. *The Conduction of the Nervous Impulse*. Liverpool University Press, Liverpool, England.
4. Adrian, E. D. 1946. *The Physical Background of Perception*. Clarendon, Oxford, England.
5. Katz, B. 1966. *Nerve, Muscle, and Synapse*. McGraw-Hill, New York
6. Sherrington, C. S. 1906. *The Integrative Action of the Nervous System*. Reprint, Yale University Press, New Haven, CT, 1966.
7. Kuffler, S. W. 1953. *J. Neurophysiol.* 16: 37–68.
8. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1977. *Proc. R. Soc. Lond. B* 198: 1–59.
9. Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W. J. 1995. *Science* 267: 1788–1792.

Раздел II

ПЕРЕДАЧА ИНФОРМАЦИИ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Глава 2

Ионные каналы и нейрональная сигнализация

Электрические сигналы, обеспечивающие функционирование нервных клеток, опосредованы потоком ионов через водопроницаемые поры клеточной мембраны. Эти поры, образованные трансмембранными белками, называются ионными каналами. К настоящему времени разработаны высокочувствительные методы, позволяющие зарегистрировать и измерить ионные токи, протекающие через одиночные ионные каналы. В этой главе будут обсуждаться такие функциональные свойства ионных каналов, как их специфичность для того или иного иона. Кроме того, будет рассмотрена регуляция ионных каналов, приводящая к генерации необходимого типа нервного импульса.

Некоторые ионные каналы избирательно проницаемы только для катионов, тогда как другие проводят только анионы. Катионные каналы могут быть высоко избирательными по отношению к одному иону, например натрию. Ионные каналы совершают переходы между открытым и закрытым состоянием и имеют, как правило, характерное время открытого состояния. Их вклад в ионный ток через клеточную мембрану определяется относительным количеством времени, которое они находятся в открытом состоянии.

Открытие канала регулируется различными механизмами. Некоторые из этих механизмов физические, такие как растяжение мембраны или изменения мембранного потенциала. Другие механизмы химические, включающие связывание активных молекул (лигандов) с активным центром, который располагается либо с внеклеточной, либо с внутриклеточной стороны канала.

Важным свойством каналов, в дополнение к кинетике открытия и закрытия, является способность открытого канала проводить ионный ток. Один из способов, которым ионы могут проникать через открытый канал, является простая диффузия. Другой способ — взаимодействие ионов с внутриканальными центрами связывания и перескакивание внутри водной поры от одного центра к другому. В любом случае движение иона через канал является пассивным и определяется градиентом концентрации и градиентом электрического потенциала на мембране.

Количество тока, проходящего через открытый канал по электрическому градиенту, зависит от **проницаемости канала** для данного типа ионов. Величина тока также зависит от **концентрации ионов** в устьях канала. Эти два фактора, проницаемость и концентрация, определяют проводимость канала.

В первой главе указывалось, что передача информации в нервной системе осуществляется двумя типами электрических сигналов: местными потенциалами, локализованными в специализированных участках нейрона, и потенциалами действия, которые передаются по всей протяженности нервной клетки. Эти сигналы меняют стабильный электрический потенциал клеточной мембраны, называемый мембранным потенциалом покоя. В покое, в зависимости от типа нейрона, мембранный потенциал имеет величину от −30 мВ до −100 мВ. Отрицательный знак потенциала означает, что внутриклеточный заряд мембраны отрицателен по отношению к внеклеточной среде.

Передача импульса в нервной системе опосредуется изменениями мембранного потенциала. В сенсорных нейронах адекватный стимул, такой как прикосновение, звук, свет, вызывает локальную **деполяризацию** (делая мембранный потенциал менее негативным) или **гиперполяризацию** (мембранный потенциал становится более негативным). Подобным же образом нейротрансмиттеры в синапсах вызывают деполяризацию или гиперполяризацию постсинаптической клетки. Потенциалы действия, представляющие собой короткие деполяризационные сигналы большой амплитуды, проводят по отросткам нейрона информацию из одного отдела нервной системы в другой.

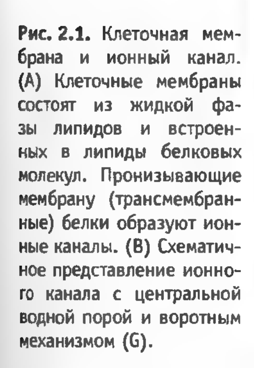
Все эти изменения мембранного потенциала вызваны движением ионов через клеточную мембрану. Например, направленное внутрь клетки движение положительно заряженных ионов натрия снижает общий отрицательный заряд мембраны или, другими словами, вызывает деполяризацию. Наоборот, результатом движения положительно заряженных ионов калия из клетки является рост общего отрицательного заряда, то есть гиперполяризация. Гиперполяризация может быть обусловлена также движением внутрь клетки отрицательно заряженных ионов хлора.

Как движутся ионы через клеточную мембрану и чем их движение регулируется? Главным путем для быстрого перемещения ионов внутрь клетки и из нее являются **ионные каналы**. Ионные каналы представляют собой встроенные в мембрану молекулы белка, которые образуют поры, проницаемые для ионов. Ионные токи регулируются через открытие и закрытие этих ионных каналов. Знание механизмов работы ионных каналов позволяет понять, как генерируются электрические сигналы.

§ 1. Свойства ионных каналов

Клеточная мембрана нервной клетки

Клеточные мембраны состоят из жидкой фазы липидов и встроенных в липиды белковых мо-


Рис. 2.1. Клеточная мембрана и ионный канал. (А) Клеточные мембраны состоят из жидкой фазы липидов и встроенных в липиды белковых молекул. Пронизывающие мембрану (трансмембранные) белки образуют ионные каналы. (B) Схематичное представление ионного канала с центральной водной порой и воротным механизмом (G).

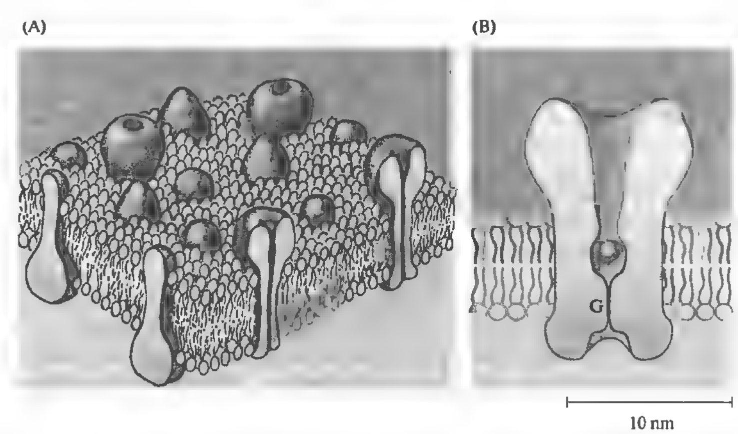


Fig. 2.1. Cell Membrane and Ion Channel. (A) The cell membrane is composed of a lipid bilayer embedded with proteins. Some of the proteins traverse the lipid layer, and some of these membrane-spanning proteins form membrane channels. (B) This schematic representation shows a membrane channel in cross section, with a central water-filled pore and channel "gate" (G). The gate opens and closes irregularly; the probability of opening may be regulated by the membrane potential, by the binding of a ligand to the channel, or by other biophysical or biochemical conditions. A sodium ion, surrounded by a single shell of water molecules, is shown to scale in the pore for size comparison.

лекул. Как показано на рис. 2.1А, молекулы липидов организованы в двухслойную мембрану (бислой) толщиной около 6 нм. Полярные гидрофильные головки липидов обращены к поверхностям мембраны, а гидрофобные хвосты вытянуты к середине бислоя. Липиды плохо пропускают воду и практически непроницаемы для ионов. Белковые молекулы частично погружены в слой липидов, либо с внеклеточной, либо с цитоплазматической стороны. Некоторые белки целиком пронизывают мембрану. Именно пронизывающие мембрану (трансмембранные) белки образуют ионные каналы. Основные ионы, участвующие в генерации электрических сигналов, такие как калий, натрий, кальций или хлор, движутся через ионные каналы пассивно благодаря градиенту концентраций и электрическому потенциалу мембраны.

Другие трансмембранные белки служат в качестве насосов и переносчиков, обеспечивающих транспорт веществ через клеточную мембрану против электрохимических градиентов. Транспортные механизмы поддерживают ионный состав цитоплазмы, удаляя или возвращая те ионы, которые прошли клеточную мембрану по их электрохимическим градиентам. Они также выполняют важную функцию переноса через клеточные мембраны субстратов метаболических реакций, таких как глюкоза и аминокислоты. Свойства транспортных молекул обсуждаются в главе 4.

Как выглядят ионные каналы?

Молекулярное строение ионных каналов и их внутримембранное устройство обсуждаются в деталях в главе 3. В контексте данной главы полезно, однако, дать несколько общих характеристик физическим свойствам ионных каналов. Трансмембранный ионный канал имеет центральную водную пору, сообщающуюся как с внеклеточным, так и с внутриклеточным пространством (рис. 2.1В). С обеих сторон канала пора расширяется, образуя устья. Узкая внутримембранная часть ионного канала формирует ворота, которые могут открываться и закрываться, регулируя прохождение ионов.

Размер белка ионного канала варьирует в значительной степени в зависимости от типа канала. Некоторые ионные каналы имеют дополнительные структуры (и связанные с ними новые свойства). На рис. 2.1В представлен типичный канал средних размеров. Для сопоставления размеров иона и ионного канала на рисунке изображен гидратированный ион натрия.

Избирательность каналов

Мембранные каналы отличаются по своей избирательности: некоторые проницаемы для катионов, другие для анионов. Некоторые катионные каналы являются селективными по отношению только к одному виду иона. Например, некоторые каналы проницаемы исключительно для ионов натрия, другие для ионов калия, прочие для ионов кальция. Однако существуют относительно неселективные катионные каналы, позволяющие проходить даже небольшим органическим катионам. Анионные каналы, связанные с передачей электрического импульса, обладают низкой специфичностью. Однако они, как правило, называются «хлорными каналами», потому что ион хлора является наиболее распространенным подвижным анионом в биологических жидкостях. Вдобавок, некоторые каналы (называемые коннексонами) соединяют соседние клетки и проницаемы как для многих неорганических ионов, так и для некоторых мелких органических молекул. Коннексоны обсуждаются в главе 7.

Открытое и закрытое состояния

Хотя для простоты мы часто представляем белковые молекулы как статические структуры, они таковыми вовсе не являются. Из-за своей тепловой энергии все большие молекулы внутренне нестабильны. При комнатной температуре химические связи растягиваются и ослабляются, то есть постоянно колеблются по отношению к устойчивому состоянию. Несмотря на то, что эти индивидуальные движения составляют величину только около 10^{-12} м (с частотой, достигающей 10^{13} Гц), такие атомные колебания могут приводить в итоге к гораздо более значительным и более медленным изменениям в структуре молекул. Это происходит потому, что многочисленные быстрые движения атомов периодически создают условия для взаимодействия функциональных групп белка, несмотря на наличие взаимных отталкивающих сил. Взаимодействия функциональных групп приводят к кинетическим переходам белка, которые, раз возникнув, могут длиться многие миллисекунды или даже секунды. Известным примером может служить молекула гемоглобина. Центры связывания кислорода заключены внутри макромолекулы этого белка,

и к ним нет постоянного свободного доступа. Связывание кислорода может быть достигнуто только за счет транзиторного доступа молекул газа к центрам связывания на молекуле гема. Таким образом, молекула гемоглобина «дышит», периодически становясь доступной для связывания кислорода, иначе данный белок был бы не способен выполнять предназначенную функцию по переносу газов[1].

Для ионных каналов функционально важными яаляются переходы между открытым и закрытым состояниями. Эти переходы совершаются практически моментально. С другой стороны, при системном изучении поведения любого ионного канала мы обнаружим, что время открытого состояния варьирует случайным образом. Иногда канал открыт только одну миллисекунду или даже меньше, хотя в следующий раз он может быть открыт на гораздо более продолжительное время (рис. 2.4). Тем не менее, каждый канал имеет характерное **среднее время открытого состояния** (τ), и все вариации происходят вокруг этого среднего показателя.

Некоторые ионные каналы открываются достаточно часто даже в покое. Иными словами, вероятность нахождения таких каналов в открытом состоянии в неактивированной клетке относительно высока. Большинство таких ионных каналов проницаемо для калия или хлора. Они важны для генерации мембранного потенциала покоя. Остальные ионные каналы при этом закрыты, то есть вероятность нахождения их в открытом состоянии очень низка. **Активация** этих каналов адекватным стимулом резко увеличивает вероятность открытия. Этот же стимул может **деактивировать** ионные каналы, бывшие активными в покое. Важно помнить, что активация или деактивация канала означает возрастание или снижение ***вероятности открытия канала***, но не увеличение или уменьшение времени открытого состояния (τ) канала.

Помимо активации и деактивации, ионный ток через каналы регулируется двумя другими факторами. Первый фактор заключается в том, что ионный канал переходит в новое конформационное состояние, в котором обычный активирующий стимул не способен вызвать открытие канала. Для ионных каналов, активируемых деполяризацией, такое состояние называется **инактивацией**. Для каналов, отвечающих на химические стимулы, это состояние известно как **десенситизация**. Второй механизм — **блок открытого канала**. Такое случается, когда, например, крупная молекула (такая как токсин) связывается с ионным каналом и физически закупоривает пору. Другим примером может служить блокирование некоторых катионных каналов ионами магния. В этом случае ионы магния сами не проникают через ионный канал, но связываются с каналом в области его устья и тем самым мешают проникновению других катионов.

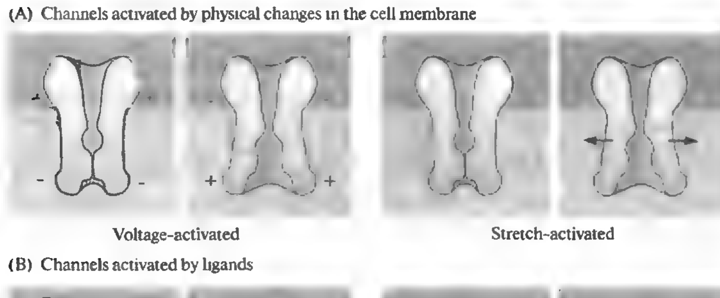
Способы активации

Рис. 2.2 суммирует представления о способах активации ионных каналов. Некоторые каналы специфически отвечают на физические изменения в клеточной мембране нейрона. Наиболее яркими представителями этой группы являются **потенциал-активируемые** каналы. Примером может служить чувствительный к потенциалу натриевый канал, который отвечает за регенеративную деполяризацию, лежащую в основе генерации потенциала действия (глава 6). К этой группе относятся также **механочувствительные** ионные каналы, которые отвечают на механическое воздействие на клеточную мембрану. Рецепторы растяжения, содержащие ионные каналы такого рода, найдены в механорецепторах кожи (глава 17).

Другие ионные каналы открываются тогда, когда химические агенты активируют связывающие центры на молекуле канала. Такие **лиганд-активируемые** ионные каналы подразделяются на две подгруппы, в зависимости от того, являются ли активные центры внутриклеточными или внеклеточными. Каналом, отвечающим на внеклеточную активацию, является катионный канал постсинаптической мембраны в скелетной мышце. Этот канал активируется нейротрансмиттером ацетилхолином, освобождающимся из двигательного нервного окончания (глава 9). Открытие ацетилхолин-активируемого ионного канала позволяет ионам натрия войти в клетку, вызывая деполяризацию мышечного волокна.

Лиганд-активируемые каналы, отвечающие на внутриклеточные стимулы, включают каналы, чувствительные к местным изменениям концентрации специфических ионов. Например, кальций-активируемые калиевые каналы активируются локальным повышением концентрации внутриклеточного кальция. Такие каналы играют важную роль в реполяризации клеточной мембраны во время завершения потенциала действия. Помимо ионов кальция, типичными представителями лигандов, активирующих ионные каналы с ци-

(A) Channels activated by physical changes in the cell membrane



(B) Channels activated by ligands

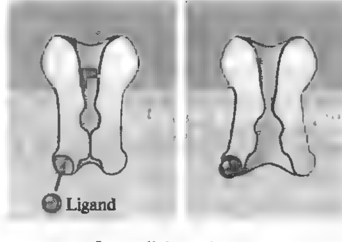


Рис. 2.2. Способы активации ионных каналов. (А) Ионные каналы, активируемые изменением мембранного потенциала или растяжением мембраны. (В) Ионные каналы, активируемые химическими агентами, либо с внеклеточной, либо с внутриклеточной стороны.

Fig. 2.2. Modes of Channel Activation. The probability of channel opening is influenced by a variety of stimuli. (A) Some channels respond to changes in the physical state of the membrane, specifically changes in membrane potential (voltage-activated) and mechanical distortion (stretch-activated). (B) Ligand-activated channels respond to chemical agonists, which attach to binding sites on the channel protein. Neurotransmitters, such as glycine and acetylcholine, act on extracellular binding sites. Included among a wide variety of intracellular ligands are calcium ions, subunits of G proteins, and cyclic nucleotides.

топлазматической стороны мембраны, являются циклические нуклеотиды. Циклический ГМФ, например, отвечает за активацию натриевых каналов в палочках сетчатки. Такой тип канала играет принципиальную роль в работе зрительного анализатора (глава 19).

Эта классификация не является достаточно строгой. Например, кальций-активируемые калиевые каналы чувствительны также к изменению потенциала, а некоторые потенциал-активируемые ионные каналы чувствительны к внутриклеточным лигандам.

§ 2. Измерение токов одиночного канала

Пэтч-кламп метод

Для измерения ионных токов через одиночные каналы первоначально был предложен непрямой метод анализа мембранного шума[2, 3]. Затем был разработан способ прямой регистрации одиночных ионных каналов с помощью метода, который называется пэтч-кламп (patch-clamp[4, 5]). В совокупности эти подходы дали прямые ответы на вопросы, касающиеся функции ионных каналов, как то: какой заряд проходит через одиночный канал? как долго канал остается открытым? как время нахождения ионного канала в открытом или закрытом состоянии зависит от мембранного потенциала?

Пэтч-кламп метод, предложенный Э. Неером, Б. Сакманном и их коллегами, значительно углубил наши знания о функционировании ионных каналов. Для пэтч-кламп регистрации необходимо, чтобы кончик стеклянной пипетки с внутренним диаметром около 1 мкм плотно контактировал с мембраной исследуемой клетки. При удачном подведении, благодаря легкому присасыванию, между клеточной мембраной и стеклом пипетки (рис. 2.3A–B) создается сопротивление больше 10^9 Ом (отсюда возник термин «гигаомный контакт», gigaohm seal). Когда пипетка соединена с соответствующим усилителем, можно зарегистрировать небольшие токи, проходящие через участок мембраны, находящейся внутри кончика пипетки (рис. 2.3F). Такая конфигурация пэтч-кламп метода называется cell attached (контакт с клеткой). Высокоомный контакт гарантирует, что ионные токи, проводимые этим участком клеточной мембраны, проходят преимущественно через

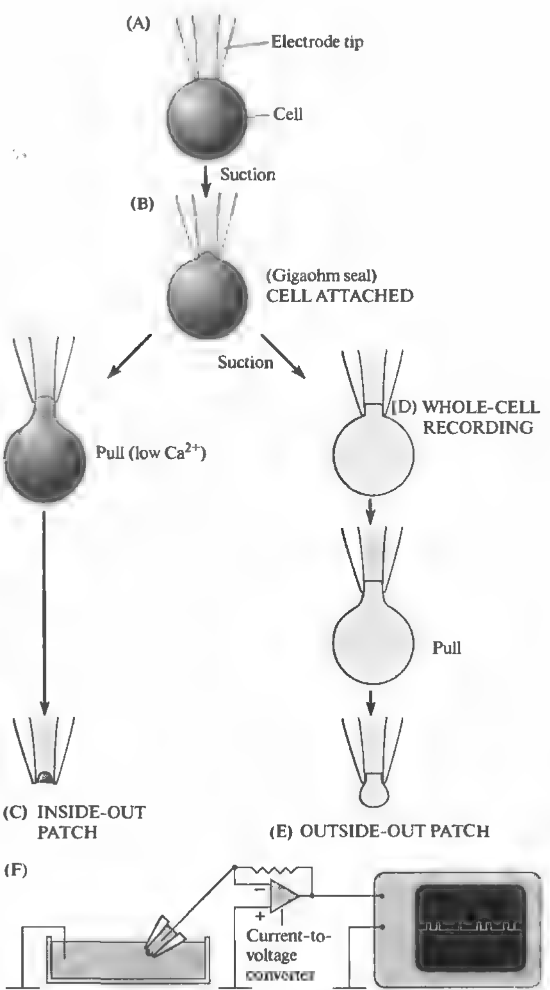


Рис. 2.3. Регистрация ионных токов методом пэтч-кламп. Электрод образует плотный контакт с мембраной (А), который благодаря легкому понижению давления превращается в гигаомный контакт (В). Оттягивание мембраны с последующим отрывом ее фрагмента приводит к конфигурации inside-out (С). Другой вариант основан на последовательном образовании конфигурации whole cell, и затем — outside-out (Е).

Fig. 2.3. Patch Clamp Recording. (A–E) Patch configurations, represented schematically. The electrode forms a seal on contact with the cell membrane (A), which is converted to a gigaohm seal by gentle suction (B). Records may then be made from the patch of membrane within the electrode tip (cell-attached patch). Pulling away from the cell results in the formation of a cell-free vesicle, whose outer membrane can then be ruptured to form an inside-out patch (C). Alternatively, the membrane within the electrode tip may be ruptured by further suction to obtain a whole-cell recording (D) or, by pulling, to obtain an outside-out patch (E). (F) Recording arrangement. The patch electrode is connected to an amplifier that converts channel currents to voltage signals. The signals are then displayed on an oscilloscope trace or computer screen so that amplitudes and durations of single-channel currents can be measured. (A–E after Hamill et al., 1981.)

усилительную аппаратуру, а не теряются в месте контакта пэтч-пипетки с клеткой. При использовании пэтч-кламп метода регистрируемые события состоят из прямоугольных токовых сигналов, отражающих процессы открытия и закрытия одиночных ионных каналов. Таким образом, мы в реальном времени можем наблюдать активность одиночных белковых молекул мембраны.

В простом случае токи одиночных каналов появляются нерегулярно и с различной продолжительностью, но с постоянной амплитудой (рис. 2.4А). В некоторых случаях, однако, картина токов может быть более сложной. Некоторые ионные каналы, например, в открытом состоянии могут иметь более чем один уровень проводимости, как это показано на рис. 2.4В. Кроме того, ионные каналы могут проявлять комплексную кинетику. Например, ток через одиночный ионный канал может выглядеть не как простой прямоугольник, а как «вспышка» открытий канала (рис. 2.4С).

Таким образом, пэтч-кламп метод предоставляет новые уникальные возможности для изучения поведения ионных каналов. Во-первых, изоляция маленького участка мембраны позволяет наблюдать активность всего нескольких ионных каналов, а не тысяч, которые активируются в целой клетке. Во-вторых, высокое сопротивление контакта дает возможность регистрировать даже крайне

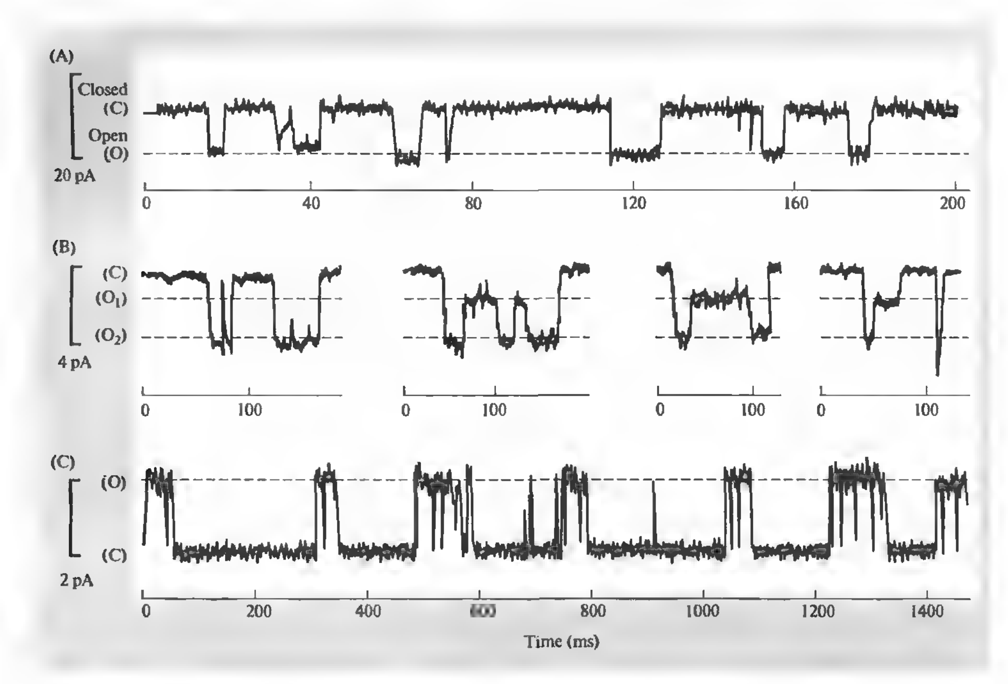


Рис. 2.4. Примеры одиночных ионных каналов, зарегистрированных методом пэтч-кламп.

Fig. 2.4. Examples of Patch Clamp Recordings. (A) Glutamate-activated channel currents recorded in a cell-attached patch from locust muscle occur irregularly, with a single amplitude and varied open times. Downward deflections indicate current flowing into the cell. (B) Acetylcholine-activated currents from single channels in an outside-out patch from cultured embryonic rat muscle reach a maximum amplitude of about 3 pA and relax to a substate current of about 1,5 pA. Downward deflections indicate inward current. (C) Pulses of outward current through glycine-activated chloride channels in an outside-out patch from cultured chick spinal cord cells are interrupted by fast closing and reopening transitions to produce bursts. (A after Cull-Candy, Miledi, and Parker, 1980; B after Hamill and Sakmann, 1981; C from A. I. McNiven and A. R. Martin, unpublished.)

малые токи. В результате мы имеем возможность точного измерения амплитуд токов одиночных ионных каналов и можем провести анализ кинетики каналов.

Конфигурации пэтч-кламп метода

Пэтч-кламп метод позволяет осуществлять также регистрацию ионных каналов и в других конфигурациях. Достигнув контакта в конфигурации cell attached, можно, отводя электрод, оттянуть участок мембраны для формирования inside-out (внутренняя сторона наружу) конфигурации (рис. 2.3C). В последнем случае цитоплазматическая сторона мембраны будет обращена к перфузионному раствору. С другой стороны, с помощью небольшого дополнительного присасывания можно прорвать участок мембраны, расположенный внутри регистрирующего электрода, обеспечив контакт последнего с цитоплазмой клетки (рис. 2.3D). В этих условиях будут регистрироваться токи в конфигурации whole-cell (целая клетка). Наконец, после получения конфигурации «целая клетка», можно оттянуть электрод от клетки, сформировав из мембраны сначала тонкую перемычку, а затем, после отделения этого участка, получить конфигурацию outside-out (наружная сторона наружу; рис. 2.3E). Каждая из этих конфигураций имеет свои преимущества, их использование зависит от типа изучаемого ионного канала и той информации, которую мы хотим получить в данном эксперименте. Например, для аппликации веществ на внешнюю сторону мембраны предпочтительной является конфигурация outside-out.

Пэтч-кламп конфигурация «целая клетка» предполагает обмен между цитоплазмой

клетки и раствором, заполняющим регистрирующую пипетку. Этот обмен, называемый иногда «диализ», может быть использован для намеренной замены внутриклеточного состава ионов на те, которые находятся в пипетке. С другой стороны (особенно в тех случаях, когда клетка мала), необходимо учитывать, что важные цитоплазматические компоненты могут быть потеряны из-за их быстрого перехода во внутрипипеточный раствор. Такой потери можно избежать, используя так называемый перфорированный пэтч-кламп метод[6]. В этом случае для формирования начальной cell attached конфигурации используется пипетка, заполненная веществом, способным формировать мембранные поры (например антибиотик нистатин). По прошествии некоторого времени в изолированном с помощью электрода участке мембраны образуются проницаемые для электролитов поры, позволяющие регистрировать ионные токи в конфигурации «целая клетка».

Внутриклеточная микроэлектродная регистрация

До разработки пэтч-кламп метода свойства ионных каналов в клеточных мембранах исследовались в экспериментах, в которых для измерения мембранного потенциала или мембранного тока использовались стеклянные микроэлектроды. Использование Лингом и Джерардом[7] в 1949 году стеклянных микроэлектродов для внутриклеточной регистрации ионных токов в живых клетках было не менее важным событием, чем введение пэтч-кламп метода три десятилетия спустя. Этот метод обеспечивал точное измерение мембранного потенциала покоя клетки, потенциала действия, а также ответов на синаптическую активацию мышечных волокон и нейронов (глава 1).

Метод внутриклеточной регистрации проиллюстрирован на рис. 2.5А. Острая стеклянная микропипетка, диаметр кончика которой не превышает 0,5 мкм, заполненная концентрированным солевым раствором (например, 3 М KCl), служит электродом и присоединяется к вольтметру для записи потенциала. Момент прокалывания пипеткой клеточной мембраны, приводящий к проникновению ее в клеточную цитоплазму, проявляется мгновенным появлением потенциала, соответствующего мембранному потенциалу покоя. При удачном проникновении в клетку мембрана обхватывает внешнюю поверхность пипетки, благодаря чему цитоплазма остается изолированной от внеклеточной жидкости.

Внутриклеточная регистрация шума ионных каналов

В начале 1970-х годов, используя нервно-мышечный синапс лягушки, Катц и Миледи предприняли оригинальные эксперименты, в которых метод внутриклеточной микроэлектродной регистрации использовался для изучения характеристик «шумов», продуцируемых медиатором ацетилхолином (АХ). В таком синапсе АХ, освобождающийся из моторного нервного окончания, открывает хемовозбудимые ионные каналы постсинаптической мембраны. Вход катионов в волокно через открытые ионные каналы вызывает деполяризацию мембраны (глава 9). Когда Катц и Миледи локально апплицировали экзогенный АХ на область синапса, они обнаружили, что вызванная деполяризация сопровождалась электрическим «шумом». Во время стабильной деполяризации быстрые колебания потенциала были гораздо больше колебаний изолинии в покое. Они предположили, что возрастание электрического шума в присутствии АХ было связано с хаотичным открытием и закрытием АХ-активируемых ионных каналов. Иными словами, аппликация АХ приводила к открытию большого числа ионных каналов, и число это случайно колебалось в зависимости от числа взаимодействий АХ с рецепторами.

Используя известную из физики технику анализа шума, Катц и Миледи смогли получить информацию о среднестатистическом поведении отдельного ионного канала, активируемого АХ. Позднее подобные эксперименты были проведены на том же объекте Anderson и Stevens[3]. В отличие от предшественников, эти исследователи измеряли мембранный ток, вызванный АХ, что позволило установить величину и продолжительность ионных токов через одиночный канал (рис. 2.5В).

Принципы анализа шума достаточно просты: во-первых, если токи одиночного канала являются большими, суммарный шум также будет большим. Во-вторых, ионные каналы, открывающиеся на относительно длительное время, будут продуцировать низкочастотный шум; наоборот, каналы, открывающиеся на короткое время, будут продуцировать высокочастотный шум. Исследование амплитудно-временных характеристик шумов, ак-

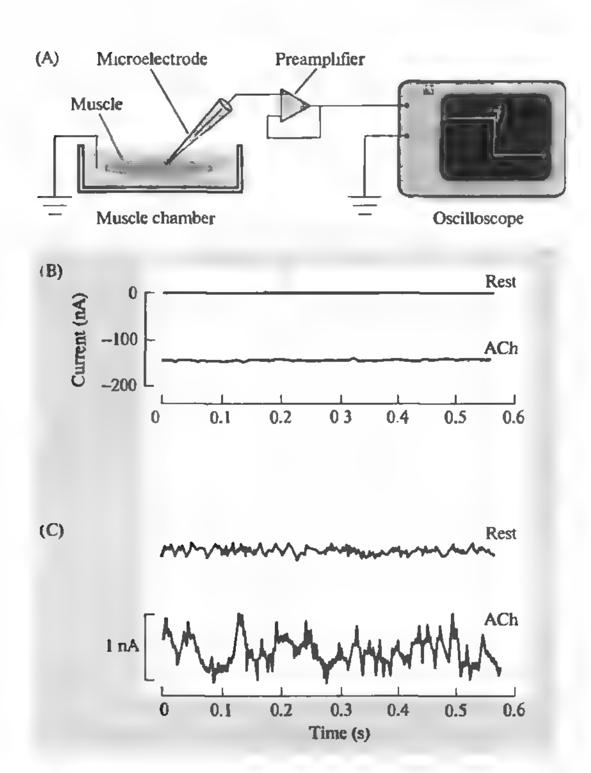


Рис. 2.5. Внутриклеточное отведение электрического «шума», производимого функционированием ионных каналов. (A) Схема установки для регистрации мембранного потенциала. (B) Внутриклеточная регистрация эффекта ацетилхолина. (C) При большем усилении виден ацетилхолиновый «шум».

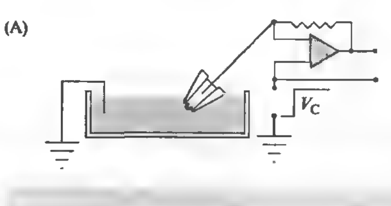
Fig. 2.5. Intracellular Recording of Channel Noise. (A) Arrangement for recording membrane potentials of muscle fibers with a microelectrode. The electrode is connected to a preamplifier, and the signals are displayed on an oscilloscope or computer screen. Penetration of the electrode into a fiber is marked by the sudden appearance of the resting potential (downward deflection on the screen). After penetration, changes in potential due to channel activation can be measured. (B) Intracellular records of the effect of acetylcholine (ACh). In this experiment, additional circuitry was used to record membrane current (rather than membrane potential). At rest (upper trace), there is no current across the membrane; application of ACh produces about 130 nA of inward current (lower trace). (C) Traces in B shown at greater amplification. The baseline shows little fluctuation at rest; the inward current produced by ACh shows relatively large fluctuations ("noise"), due to random opening and closing of ACh-activated channels. Analysis of the increased noise yields values for the single-channel current and the mean open time of the channels. (B and C after Anderson and Stevens, 1973.)

тивированных АХ в нервно-мышечном синапсе, показало, что через одиночный открытый ионный канал проходит около 10 миллионов ионов в секунду. Кроме того, выяснилось, что значение среднего открытого времени (τ) ионного канала составляет от 1 до 2 мс.

Несмотря на широкое вытеснение пэтч-кламп методом, анализ шума до сих пор используется для изучения ионных каналов в клетках, которые не поддаются исследованию с помощью пэтч-клампа, например, в некоторых областях центральной нервной системы[8]. Кроме того, анализ шума является сравнительно быстрым методом для получения информации о свойствах большой популяции каналов и используется в комбинации с пэтч-кламп регистрацией от целой клетки для идентификации типов каналов. Тем не менее, надо понимать, что с помощью анализа шума невозможно получить детальную информацию о поведении одиночного канала, особенно в каналах со сложной кинетикой или при наличии нескольких уровней проводимости канала.

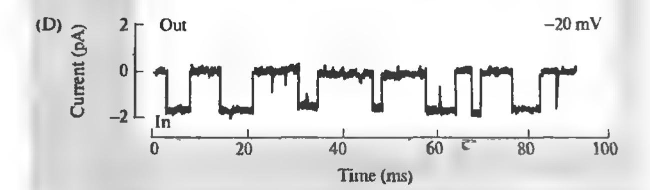
Проводимость каналов

Кинетическое поведение канала, то есть время его нахождения в закрытом и открытом состояниях, может предоставить информацию о механизмах открытия и закрытия канала, а также о константах скоростей этих процессов. С другой стороны, величина тока, проходящего через ионный канал, является прямым отражением того, как быстро проникающие ионы движутся через канал. Ток ионов зависит не только от свойств канала, но также от трансмембранного потенциала. Пример такого рода показан на рис. 2.6. На этом рисунке изображен фрагмент мембраны, который содержит один спонтанно активный ионный канал, проницаемый для калия. Растворы, как в пипетке, так и в ванночке для объекта, содержат одинаковую (150 ммоль) концентрацию ионов калия. Ионы калия через открытый канал могут двигаться в обоих направлениях. Однако поскольку концентрации ионов по обе стороны мембраны идентичны, а трансмембранный потенциал отсутствует, то нет никакого движения ионов ни в одном









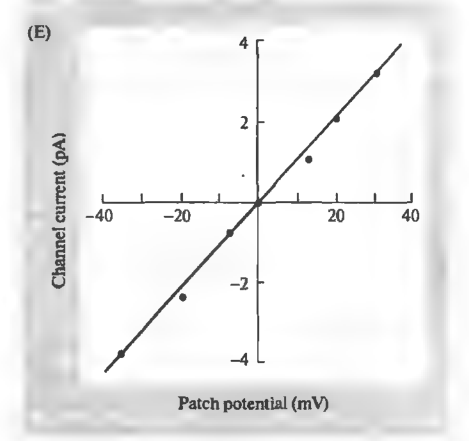


Рис. 2.6. Влияние потенциала на ток через одиночный калиевый канал в симметричном растворе ионов калия по обе стороны мембраны. (А) Схема установки. (B–D) Примеры токов через одиночные ионные каналы при разных уровнях мембранного потенциала. (E) Ток через калиевый канал как функция мембранного потенциала.

Fig. 2.6. Effect of Potential on Currents through a single, spontaneously active potassium channel in an outside-out patch, with 150 m*M* potassium in both the electrode and the bathing solution. (A) The recording system. The output from the patch clamp amplifier is proportional to the current across the patch. The potential across the patch is equal to the potential (VC) applied to the input of the amplifier as shown. Positive charge flowing out of the electrode is defined as positive current. (B) When no potential is applied to the patch, no channel currents are seen because there is no net flux of potassium through the channels. (C) Application of +20 mV to the electrode results in an outward current (upward deflections) of about 2 pA through the channels. (D) A −20 mV potential results in inward channel currents (downward deflections) of the same amplitude as in C. (E) Channel currents as a function of applied voltage. The slope of the line is the channel conductance (γ). In this case, $\gamma = 110$ pS (picosiemens).

из направлений. Поэтому на данном рис. 2.6B показано отсутствие мембранного тока.

Пэтч-кламп метод имеет достоинство, которое еще не было упомянуто: мы можем менять потенциал на регистрирующей пипетке и варьировать, таким образом, трансмембранную разность потенциалов. Например, при мембранном потенциале +20 мВ каждое открытие калиевого ионного канала сопровождается током, направленным наружу (рис. 2.6C). Это связано с тем, что положительно заряженные ионы калия двигаются через канал по электрическому градиенту между раствором в пипетке и в ванночке. С другой стороны, когда внутри пипетки создан отрицательный потенциал величиной в −20 мВ

(рис. 2.6D), ток направлен в обратном направлении (через открытый канал в пипетку).

Зависимость тока от величины потенциала на мембране представлена на рис. 2.6E. Эта зависимость является линейной: ток (I), проходящий через канал, пропорционален потенциалу (V):

$$I = \gamma V.$$

Это формула представляет собой преобразованный закон Ома (приложение А). Константа γ называется **проводимостью канала**. При одном и том же потенциале на мембране канал с высокой проводимостью переносит много тока, канал с низкой проводимостью проводит малый ток.

Проводимость измеряется в сименсах (См). В нейронах трансмембранный потенциал обычно выражается в милливольтах (1 мВ $= 10^{-3}$ В), токи одиночных ионных каналов в пикоамперах (1 пА $= 10^{-12}$ А), проводимость в пикосименсах (1 пСм $= 10^{-12}$ См). На рис. 2.6 потенциал +20 мВ продуцировал ток около 2,2 пА, соответственно проводимость канала ($\gamma = I/V$) составила 2,2 пА/20 мВ = 110 пСм.

Проводимость и проницаемость

Проводимость ионного канала γ зависит от двух факторов: во-первых, от той легкости, с которой ионы проходят через открытый канал. Это внутреннее свойство канала известно как **проницаемость канала**. Во-вторых, проводимость зависит от концентрации ионов около устьев канала. Ясно, что если ионы калия отсутствуют как внутри, так и снаружи клетки, то не может быть и тока. При этом становится не важно, какова проницаемость канала или насколько велик мембранный потенциал. Если присутствует всего несколько ионов калия, то, при одной и той же величине проницаемости и стандартном трансмембранном потенциале, ток через ионный канал будет гораздо меньше, чем при избыточной концентрации ионов калия. Эти взаимоотношения могут быть представлены следующим образом:

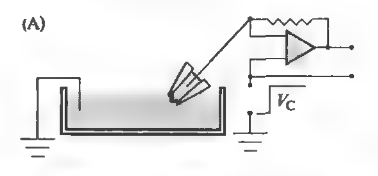
Открытый канал → проницаемость

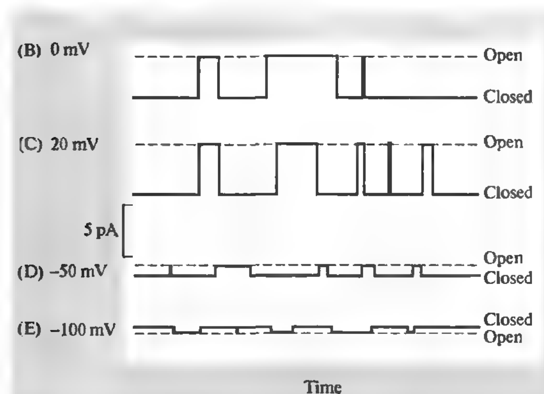
Проницаемость + ионы → проводимость.

Равновесный потенциал

В уже рассмотренных примерах ионного тока концентрации ионов калия были одинаковыми по обе стороны мембраны. Что произойдет, если мы сделаем концентрации этого иона в пипетке и в ванночке различными? Представим, что после получения конфигурации outside-out, как это показано на рис. 2.7A, концентрация калия в ванночке составляет 3 ммоль (подобно нормальной внеклеточной концентрации этого иона), а внутри электрода эта концентрация равняется 90 ммоль (подобно цитоплазматической концентрации). Если калиевый канал в мембране будет открыт, то ионы калия начнут двигаться из пипетки в ванночку. Такой ток будет происходить даже при отсутствии потенциала на пипетке (рис. 2.7B), так как движущей силой для ионов калия является градиент концентраций. Если же мы зарядим пипетку положительно, градиент потенциала на мембране будет еще более увеличивать движение положительно заряженных ионов калия наружу (к минусу). В результате ток ионов через калиевые каналы будет возрастать (рис. 2.7C). И наоборот, если придать пипетке отрицательный заряд, движение ионов калия из электрода наружу через мембрану замедлится и канальный ток уменьшится (рис. 2.7D). Важно отметить, что при достаточно большом отрицательном заряде ионы калия начнут движение *внутрь*, то есть против градиента концентрации (рис. 2.7E). Зависимость ионного тока от напряжения на мембране для этой экспериментальной модели показана на рис. 2.7F.

Рис. 2.7F иллюстрирует, что ток ионов калия через канал зависит от электрического потенциала мембраны и градиента концентрации калия. Сочетание этих двух факторов формирует **электрохимический градиент** для калия. В отличие от начального результата, полученного при одинаковых концентрациях ионов калия по обе стороны мембраны (рис. 2.6), в данном примере ионный ток равен нулю при потенциале на пипетке −85 мВ. При этом потенциале стремление ионов калия выйти через канал наружу по градиенту концентраций полностью уравновешено трансмембранной разницей электрического потенциала, которая направляет движение ионов в противоположном направлении. Этот трансмембранный потенциал называется **калиевым равновесным потенциалом** (E_K). Равновесный потенциал зависит только от концентрации ионов по обе стороны мембраны, но не от свойств ионного канала или механизма проникновения ионов через канал.





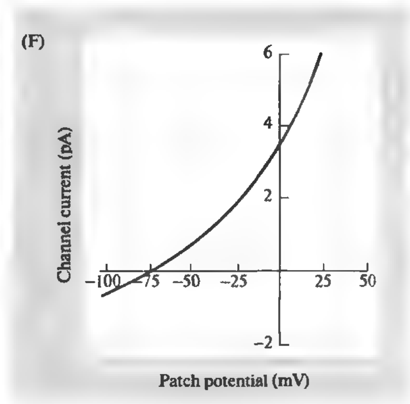


Рис. 2.7. Потенциал реверсии для калиевого тока в асимметричном растворе калия. Остальные обозначения такие же, как на рис. 2.6.

Fig. 2.7. Reversal Potential For Potassium Currents in a hypothetical experiment using an outside-out patch with the concentration of potassium in the recording pipette ("intracellular" concentration) 90 m*M* and in the bathing solution ("extracellular" concentration) 3 m*M*. (A) Recording arrangement as in Figure 2.6. (B) With no potential applied to the pipette, the flux of potassium from the electrode to the bath along its concentration gradient produces outward channel currents. (C) When a potential of +20 mV is applied to the pipette, outward currents increase in amplitude. (D) Application of −50 mV to the pipette reduces outward currents. (E) At −100 mV, currents are reversed. (F) The current–voltage relation indicates zero current at −85 mV, which is the potassium equilibrium potential (EK).

Уравнение Нернста

Какой именно потенциал необходим для того, чтобы уравновесить эффект реальной разницы концентраций ионов калия? Предположение о том, что E_K просто пропорционален разнице между внутриклеточной $[K]_i$ и внешней $[K]_o$ концентрацией ионов калия, не совсем верно. Точнее, равновесный потенциал зависит от разницы между *логарифмами* концентраций:

$$E_K = k(\ln [K]_o - \ln [K]_i).$$

Константа k определяется из формулы $RT/(zF)$, где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, z — валентность иона (в данном случае +1) и F — число Фарадея (число кулонов электричества в 1 молярном растворе иона). Таким образом,

$$E_K = \frac{RT}{zF} \cdot (\ln [K]_o - \ln [K]_i),$$

что можно представить как:

$$E_K = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}.$$

Это уравнение называется уравнением Нернста для ионов калия. Аналогично, можно построить уравнение Нернста и для других основных ионов. Отношение $RT/(zF)$ измеряется в вольтах и равно примерно 25 мВ при температуре 20° С. Иногда более удобно пользоваться десятичным (log), а не натуральным логарифмом (ln). Тогда значение

$RT/(zF)$ должно быть умножено на ln 10, или 2,31, что даст в результате 58 мВ. То есть:

$$E_K = 25 \ln \frac{[K]_o}{[K]_i} = 58 \log \frac{[K]_o}{[K]_i}.$$

При температуре тела млекопитающих (37° C) вместо 58 мВ следует использовать 61 мВ. Для клетки, показанной на рис. 2.7, значение $E_K = -85$ мВ соответствует отношению концентраций 1/30.

Необходимо отметить, что диффузия иона по градиенту концентрации не строго зависит от его концентрации. Во всех растворах, кроме очень слабых, ионы взаимодействуют друг с другом, что проявляется в электростатическом притяжении или отталкивании заряженных частиц. Результатом таких взаимодействий является снижение эффективной концентрации ионов. Эффективная концентрация иона называется **активностью.** Поэтому более точным теоретическим параметром для уравнения Нернста является соотношение активностей, а не соотношение концентраций. Однако поскольку суммарные концентрации ионов внутри и вне клетки близки (глава 5), соотношение активности ионов не будет существенно отличаться от соотношения концентраций.

Движущая сила

Рис. 2.7F иллюстрирует важный момент для прохождения тока через ионные каналы: без приложения потенциала ток составляет около 4 pA, тогда как с потенциалом на пипетке −85 мВ ионный ток равен нулю. Следовательно, ионный ток определяется не абсолютным значением мембранного потенциала (V_m), а разницей между мембранным потенциалом и равновесным потенциалом для данного иона, в данном случае для иона калия (E_K). Эта разница $V_m - E_K$ является **движущей силой** для прохождения ионов через канал. Вновь обратимся к рис. 2.7F: при мембранном потенциале, равном нулю, движущая сила составляет +85 мВ.

Нелинейные отношения «ток—напряжение»

Вторым характерным свойством зависимости «ток—напряжение» на рис. 2.7F, в отличие от рис. 2.6E, является ее нелинейность. При сдвиге от равновесного потенциала −85 мВ в сторону деполяризации (то есть к нулю) ток меняется более быстро, чем при переходе в сторону гиперполяризации. Это происходит из-за того, что проводимость канала является функцией концентрации иона. В нашем примере концентрация ионов калия внутри пипетки гораздо выше концентрации этого иона во внешнем растворе. Это приводит к тому, что током, идущим наружу, переносится больше ионов, чем током, направленным внутрь. По мере сдвига от равновесного потенциала в сторону деполяризации, этот эффект становится все более заметным. Поэтому зависимость «ток—напряжение» имеет направленный вверх изгиб, несмотря на то, что проницаемость этого типа канала практически не зависит от потенциала.

Нелинейные отношения «ток—напряжение» наблюдаются также в ионных каналах, обладающих выпрямляющими свойствами. В таких каналах проницаемость зависит от потенциала, поэтому при определенном потенциале ионы двигаются в одном направлении гораздо легче, чем в обратном. Одним из таких примеров является потенциалзависимый калиевый канал, называемый каналом внутреннего выпрямления (inward rectifier). Такой тип канала позволяет ионам калия двигаться внутрь клетки при потенциале, более негативном, чем равновесный калиевый потенциал. Однако при потенциалах, менее негативных по отношению к равновесному калиевому потенциалу, выходящий ток или очень мал, или полностью отсутствует.

Проницаемость ионных каналов

Каким же образом ионы проходят через каналы? Одним из возможных механизмов является диффузия через водную среду, заполняющую пору. Представление о диффузии лежало в основе ранних гипотез о процессе ионной проницаемости. Однако для большинства каналов простая диффузия описывает ионную проницаемость недостаточно адекватно. Главная причина в том, что проникающие ионы вступают во взаимодействие с белками ионного канала. Так, в растворе, благодаря наличию заряда, ионы всегда покрыты гидратной оболочкой (рис. 2.1). В случае катионов молекулы воды ориентированы таким образом, что отрицательно заряженный кислород

обращен в сторону иона. Если пора ионного канала достаточно узкая, необходимо некоторое количество энергии, чтобы освободить ион от ассоциированных молекул воды и позволить ему проникнуть через этот участок (глава 3). В канале ион может быть объектом притяжения или отталкивания электростатическими зарядами стенки канала. Взаимодействие иона с комплементарными центрами ионного канала может приводить к тому, что процесс проникновения будет представлять собой своеобразный «перескок» иона с одного центра связывания на другой. Такие взаимодействия иона со стенкой канала могут влиять как на ионную избирательность, так и на скорость потока ионов. Модели, описывающие ионную проницаемость по этому механизму, называются моделями Эйринга[9]. В целом, такие модели описывают ионную избирательность и проводимость гораздо более адекватно, чем модели простой диффузии.

Значение ионных каналов

Функционирование ионных каналов, описанных в этой главе, дает возможность нейронам реагировать на сигналы из внешней среды или от других нейронов, передавать импульсы на большие расстояния к исполнительным органам или к другим нейронам. Таким образом, вся сложная система восприятия и анализа сигналов, так же как генерация двигательной команды, определяется, в конечном счете, активностью ионных каналов.

Важно понимать, что все ионные токи, лежащие в основе нейрональной сигнализации, обусловлены пассивным движением ионов через открытые ионные каналы по градиенту концентрации и в зависимости от заряда клеточной мембраны. Другими словами, нейроны используют электрохимические градиенты для генерации потока ионов и, как следствие, для формирования электрических сигналов. Потенциально ионные токи могли бы нарушать эти градиенты, однако в действительности этого не происходит, так как клетки используют энергию, образуемую в ходе метаболизма, для поддержания ионного состава цитоплазмы. Специализированные механизмы, лежащие в основе активного транспорта ионов, описаны в главе 4.

Выводы

- Электрические сигналы в нервной системе генерируются движением ионов через мембрану нервной клетки. Эти ионные токи протекают через водные поры трансмембранных белков, известных как ионные каналы.
- Каналы различаются по своей избирательности: некоторые катионные каналы пропускают только натрий, калий или кальций, другие являются менее избирательными. Анионные каналы сравнительно не избирательны для малых анионов, но они пропускают в основном ионы хлора, так как хлор является самым распространенным анионом внеклеточной и внутриклеточной жидкостей.
- Каналы совершают переходы между открытым и закрытым состояниями. Каждый канал имеет присущее ему время открытого состояния. Когда каналы активированы, вероятность их открытия возрастает. Деактивация снижает частоту открытия. Каналы также могут быть инактивированы или блокированы.
- Каналы могут быть классифицированы по типу их активации: механочувствительные, потенциал-активируемые, лиганд-активируемые.
- Ионы движутся через каналы пассивно в соответствии с градиентом концентрации или электрическим градиентом на мембране.
- Результирующий поток ионов через канал по градиенту концентрации может быть снижен противоположно направленным электрическим градиентом. Электрический потенциал, снижающий результирующий поток какого-либо иона до нуля, называется равновесным потенциалом данного иона. Отношение между равновесным потенциалом и градиентом концентрации описывается уравнением Нернста.
- Движущая сила для движения ионов через мембрану есть разница между равновесным и мембранным потенциалами. Ионный ток, протекающий через одиночный канал, зависит от движущей силы для данного иона и проводимости канала для этого иона. В свою очередь, проводимость зависит от проницаемости данного канала и внешней и внутренней концентраций ионов.

Рекомендуемая литература

- Hille, B. 1992. *Ion Channels in Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 291–314.
- Pun, R. Y. K., and Lecar, H. 1998. Patch clamp techniques and analysus. In N. Sperelakis (ed.), *Cell Physiology Source Book*, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 391–405.

Цитированная литература

1. Karplus, M., and Petsko, G. A. 1990. *Nature* 347: 631–639.
2. Katz, B., and Miledi, R. 1972. *J. Physiol.* 224: 665–699.
3. Anderson, C. R., and Stevens, C. F. 1973. *J. Physiol.* 235: 665–691.
4. Neher, E., Sakmann, B., and Steinbach, J. H. 1978. *Pflügers Arch.* 375: 219–228.
5. Hamill, O. P., et al. 1981. *Pflügers Arch.* 391: 85–100.
6. Horn, R., and Marty, A. 1988. *J. Gen. Physiol.* 92: 145–149.
7. Ling, G., and Gerard, R. W. 1949. *J. Cell Comp. Physiol.* 34: 383–396.
8. Gold, M. R., and Martin, A. R. 1983. *J. Physiol.* 342: 99–117.
9. Johnson, F. H., Eyring, H., and Polissar, M. J. 1954. *The Kinetic Basis of Molecular Biology.* Wiley, New York.

Глава 3

Структура ионных каналов

Молекулярная структура ионных каналов может быть расшифрована и соотнесена с их функцией с помощью различных экспериментальных методов. Эти методы включают: биохимическое выделение белков, клонирование, определение последовательности аминокислот, точечные мутации для изменения аминокислотной последовательности в отдельных участках молекулы белка, экспрессию ионных каналов в чужеродных клетках, таких, например, как ооциты лягушек ксенопус (*Xenopus*). Кроме того, физическое устройство каналов может быть изучено посредством электронной микроскопии, электронной и рентгеновской дифракции.

Наиболее широко комбинация этих экспериментальных подходов была использована для изучения лиганд-активируемых каналов ацетилхолинового рецептора. Этот рецептор состоит из пяти отдельных субъединиц, собранных кольцом вокруг центра. Две из них — α-субъединицы — содержат рецепторы для медиатора ацетилхолина. Каждая субъединица имеет четыре трансмембранных домена (обозначаемых как M1, M2, M3 и M4), соединенных с помощью внутри- и внеклеточных фрагментов белковой молекулы. M2 домены всех пяти субъединиц формируют проницаемую для ионов пору ионного канала. Ацетилхолиновый рецептор является представителем суперсемейства лиганд-активируемых рецепторов, включающего также рецепторы для глицина, γ-аминомасляной кислоты (ГАМК) и серотонина.

Потенциал-активируемые каналы образуют другое суперсемейство ионных каналов. Установлено, что потенциал-активируемый натриевый канал является единой большой молекулой с четырьмя повторяющимися доменами, расположенными кольцом вокруг центра. Каждый домен содержит шесть трансмембранных сегментов (обозначаемых как S1–S6). В каждом из четырех доменов фрагмент белка между сегментами S5 и S6 обращен к центру и формирует проницаемую для ионов пору. Потенциал-активируемые кальциевые каналы имеют сходную структуру. Потенциал-активируемые калиевые каналы также подобны по конфигурации натриевым или кальциевым каналам, но с одним важным отличием: они состоят не из одной молекулы, а из 4 отдельных субъединиц.

Аминокислотные последовательности и детальная информация о структуре получены и для других семейств рецепторов и ионных каналов. За редким исключением все они представляют собой совокупность нескольких субъединиц, каждая из которых состоит как минимум из двух трансмембранных доменов и участка, формирующего водную пору ионного канала.

Для успешного функционирования нервной системы нейроны должны обладать весьма разнообразным репертуаром электрической активности. Например, импульс, генерируемый одним из нейронов, может подавить электрическую активность соседних нервных клеток, активировать ряд отдаленных нейронов, и, наконец, плавно модулировать активность третьей группы нейронов. Все эти варианты поведения зависят, в конечном счете, от активации или деактивации ионных каналов, регулирующих ионные токи через мембраны нервных клеток.

Поэтому столь важно понимать, как функционируют ионные каналы. Это понимание базируется на знании молекулярной структуры белков каналов. Для большого числа ионных каналов определены последовательности аминокислот в белковой молекуле, а также предположительная конфигурация белка в плазматической мембране. В этой главе мы рассмотрим в деталях два типа ионных каналов. Первая группа — это лиганд-активируемые каналы, представленная никотиновым ацетилхолиновым рецептором. Вторая группа — потенциал-активируемые катионные каналы, которые обеспечивают движение

ионов натрия, калия и кальция через клеточную мембрану. Эти два типа каналов служат моделями, на которых базируются постулаты о структуре прочих каналов.

Как же выглядит молекула ионного канала и как она функционирует? В последние годы осуществлен значительный прогресс в понимании структуры ионных каналов. В получении этой информации были использованы два экспериментальных достижения. Во-первых, были изолированы клоны ДНК, кодирующие структуру ионных каналов, что позволило получить информацию об аминокислотной последовательности этих белков. Техника, используемая при этом, давала также возможность менять основания в молекуле ДНК (сайт-направленный мутагенез) и заменять, таким образом, в выбранном участке белка одну аминокислоту другой.

Вторым достижением была разработка техники, посредством которой клоны ДНК были использованы для экспрессии ионных каналов в чужеродных клетках, таких как ооциты *Xenopus*. Этот прием позволил оценить функциональные свойства клонированных ионных каналов электрофизиологическими методами. Комбинация двух методов позволяла манипулировать специфическими участками молекулы ионного канала, чтобы определить значение этих участков для его функционирования. Применение этих методов позволило выяснить, что в ряде случаев замена даже одной аминокислоты меняет ионную избирательность канала.

§ 1. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор

Одним из первых изученных в деталях ионных каналов был никотиновый ацетилхолиновый рецептор (АХР). Заметим, что для лиганд-активируемых каналов предпочтительнее термин «рецептор», чем часто используемый термин «канал», так как характеристика таких белковых молекул в первую очередь зависит от связывания молекул агонистов, антагонистов, токсинов и антител, чем от специфических характеристик ионного канала. Никотиновые АХР представлены в постсинаптических мембранах скелетных мышечных волокон позвоночных, в нейронах нервной системы беспозвоночных и позвоночных, в синапсах электрического органа электрического ската.

Эти рецепторы активируются АХ, освобождающимся из пресинаптических нервных окончаний. При активации АХР открываются ионные каналы, через которые катионы могут проходить клеточную мембрану постсинаптической клетки. Рецепторы обозначаются как «никотиновые», поскольку действие АХ воспроизводится никотином, и для того, чтобы отличать их от других АХР, которые активируются мускарином. Мускариновые АХР сами не являются ионными каналами; их активация запускает систему внутриклеточных посредников, которые являются непосредственными регуляторами активности ионных каналов.

Биохимической изоляции никотинового АХР способствовало наличие концентрированного источника рецепторов в синаптических мембранах электрического органа ската *Torpedo*. Электрический орган этой и других подобных электрических рыб представляет собой редуцированные мышечные клетки (электроциты). Ряды электроцитов анатомически выстроены таким образом, что при одновременной их деполяризации общий разряд достигает 100 V — величину достаточную, чтобы оглушить добычу. После экстракции из мембран электроцитов молекулы АХР были отделены от других мембранных белков благодаря их высокому аффинитету (сродству) к α-бунгаротоксину. Этот нейротоксин обладает высокой специфичностью по отношению к АХР в электроцитах и в скелетной мышце позвоночных. Было обнаружено, что АХР из *Torpedo* состоит из 4 белковых субъединиц (α, β, γ и δ) с молекулярной массой около 40, 50, 60 и 65 кДа (килодальтон), соответственно. Изолированный АХР, после включения в искусственные липидные мембраны, сохраняет большинство функциональных характеристик, присущих нативному ионному каналу[1].

Физические свойства АХР рецептора

Размер и ориентация ионного канала АХР по отношению к мембране были определены с помощью электронной микроскопии высокого разрешения, а также другими физическими методами[2)–4)]. Физическая структура АХР показана на рис. 3.1. Пять субъединиц — две α, одна β, одна γ и одна δ — образуют кольцо вокруг центральной поры. Диаметр молекулы в ее самой широкой, внеклеточной части, составляет около 8,5 нм, а длина АХР —

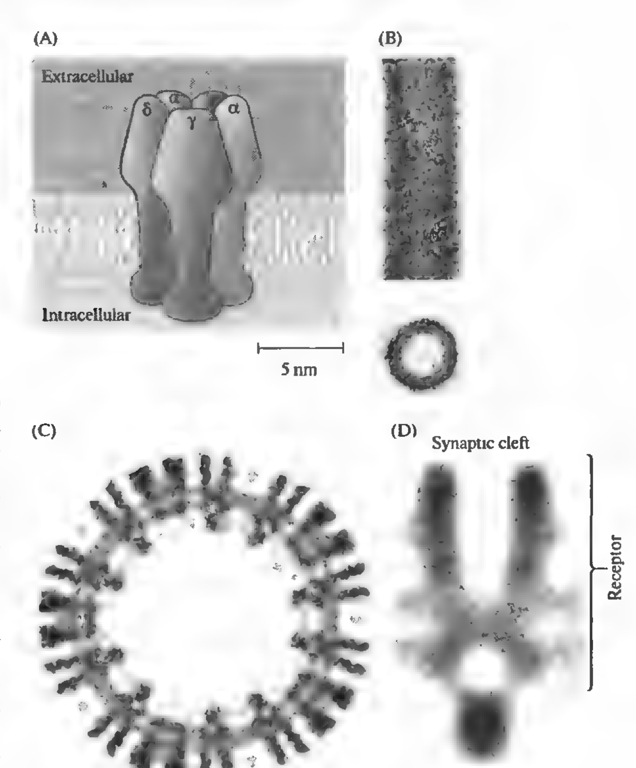


Рис. 3.1. АХ рецептор. (A) АХ рецептор состоит из пяти субъединиц — двух α, одной β, одной γ и одной δ-субъединицы, расположенных радиально с углом около 72° вокруг центра. α-субъединицы содержат центры связывания АХ. Позиция β- и γ-субъединиц может быть обратной. (B) Продольное и поперечное сечение электронно-микроскопического изображения цилиндрических везикул постсинаптической мембраны *Torpedo*, на котором показаны плотно расположенные АХ рецепторы. (C) Поперечный разрез такого цилиндра с большим увеличением. (D) Тот же объект под еще большим увеличением, на котором показан одиночный АХ рецептор.

Fig. 3.1. The ACh Receptor. (A) The complete AChR consists of five subunits—two α, one β, one γ, and one δ—spaced radially in increments of about 72° around a central core. The a subunits contain receptor sites for acetylcholine. The position of the β and γ subunits may be reversed. (B) Longitudinal and transverse electron microscope images of cylindrical vesicles from postsynaptic membranes of Torpedo, showing closely packed ACh receptors. (C) Transverse section of the tube at higher magnification. (D) Further enlarged image of a single ACh receptor, showing its position and size relative to the membrane bilayer. Dense blob under the receptor is intracellular receptor-associated protein. (A based on Stroud and Finer-Moore, 1985, and Toyoshima and Unwin, 1988; B, C, and D kindly provided by N. Unwin.)

11 нм. Внеклеточная часть АХР выдается над поверхностью мембраны на 5 нм. Измерение избирательности ионного канала АХР по отношению к большим катионам предполагает, что диаметр центральной поры составляет примерно 0,7 нм[5, 6)].

Аминокислотная последовательность субъединиц АХР

После предварительных биохимических исследований[7)] были клонированы кДНК для всех субъединиц АХР и определены последовательности аминокислот[8)–10)] в каждой из них. Рис. 3.2 показывает аминокислотную последовательность α-субъединицы АХР из электрического органа *Torpedo* (соответствующие субъединицы АХР человека и коровы несколько отличаются от представленной на рисунке). Аминокислотные последовательности других трех субъединиц весьма сходны (гомологичны) со структурой α-субъединицы, с незначительными вариациями нескольких аминокислот. Поэтому принципы структурной конфигурации, обсуждаемые для α-субъединицы, в основном применимы и других субъединиц.

Вторичная и третичная структура АХР

Хотя первичная структура субъединиц не дает информации о том, каким образом белковая молекула АХР организована в мембране, можно приблизиться к пониманию этого вопроса путем построения молекулярных

Met Ile Leu Cys

−20 −10
Ser Tyr Trp His Val Gly Leu Val Leu Leu Leu Phe Ser Cys Cys Gly Leu Val Leu Gly

10 20
Ser Glu His Glu Thr Arg Leu Val Ala Asn Leu Leu Glu Asn Tyr Asn Lys Val Ile Arg

30 40
Pro Val Glu His His Thr His Phe Val Asp Ile Thr Val Gly Leu Gln Leu Ile Gln Leu

50 60
Ile Ser Val Asp Glu Val Asn Gln Ile Val Glu Thr Asn Val Arg Leu Arg Gln Gln Trp

70 80
Ile Asp Val Arg Leu Arg Trp Asn Pro Ala Asp Tyr Gly Gly Ile Lys Lys Ile Arg Leu

90 100
Pro Ser Asp Asp Val Trp Leu Pro Asp Leu Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe

110 120
Ala Ile Val His Met Thr Lys Leu Leu Leu Asp Tyr Thr Gly Lys Ile Met Trp Thr Pro

130 140
Pro Ala Ile Phe Lys Ser Tyr Cys Glu Ile Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Gln Gln

150 160
Asn Cys Thr Met Lys Leu Gly Ile Trp Thr Tyr Asp Gly Thr Lys Val Ser Ile Ser Pro

170 180
Glu Ser Asp Arg Pro Asp Leu Ser Thr Phe Met Leu Ser Gly Glu Trp Val Met Lys Asp

190 200
Tyr Arg Gly Trp Lys His Trp Val Tyr Tyr Thr Cys Cys Pro Asp Thr Pro Tyr Leu Asp

210 220
Ile Thr Tyr His Phe Ile Met Gln Arg Ile Pro Leu Tyr Phe Val Val Asn Val Ile Ile

230 240
Pro Cys Leu Leu Phe Ser Phe Leu Thr Gly Leu Val Phe Tyr Leu Pro Thr Asp Ser Gly
M1

250 260
Glu Lys Met Thr Leu Ser Ile Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Leu Val Ile
M2

270 280
Val Glu Leu Ile Pro Ser Thr Ser Ser Ala Val Pro Leu Ile Gly Lys Tyr Met Leu Phe

290 300
Thr Met Ile Phe Val Ile Ser Ser Ile Ile Ile Thr Val Val Val Ile Asn Thr His His
M3

310 320
Arg Ser Pro Ser Thr His Thr Met Pro Gln Trp Val Arg Lys Ile Phe Ile Asp Thr Ile

330 340
Pro Asn Val Met Phe Phe Ser Thr Met Lys Arg Ala Ser Lys Glu Lys Gln Glu Asn Lys

350 360
Ile Phe Ala Asp Asp Ile Asp Ile Ser Asp Ile Ser Gly Lys Gln Val Thr Gly Glu Val

370 380
Ile Phe Gln Thr Pro Leu Ile Lys Asn Pro Asp Val Lys Ser Ala Ile Glu Gly Val Lys

390 400
Tyr Ile Ala Glu His Met Lys Ser Asp Glu Glu Ser Ser Asn Ala Ala Glu Glu Trp Lys

410 420
Tyr Val Ala Met Val Ile Asp His Ile Leu Leu Cys Val Phe Met Leu Ile Cys Ile Ile
M4

430
Gly Thr Val Ser Val Phe Ala Gly Arg Leu Ile Glu Leu Ser Gln Glu Gly

Рис. 3.2. Аминокислотная последовательность субъединицы АХР. Затемненные области показывают гидрофобные участки (M1, M2, M3 и M4), способные формировать трансмембранные α-спирали.

Fig. 3.2. Amino Acid Sequence of the AChR Subunit. Sequences in color indicate hydrophobic regions (M1, M2, M3, and M4) that are capable of forming membrane-spanning a helices. In the M1 region, 16 of the 22 amino acids are hydrophobic. The other membrane-spanning regions are of similar composition. The initial underscored segment is the signal sequence. (After Numa et al. 1983.)

моделей, основываясь на данных об аминокислотной последовательности белка. Логично предположить, что, как у любых крупных белков, сегменты молекулы свернуты в упорядоченные мелкие α- или крупные β-спирали. Эти вторичные структуры, в свою очередь, сворачиваются, образуя третичные структуры. Наконец, пять субъединиц (две α, одна β, одна γ и одна δ) соединяются вместе, формируя конечную четвертичную структуру — полноценный ионный канал.

Для построения модели вторичной и третичной структуры АХР существенную роль

сыграло обнаружение в первичной последовательности белка обширных участков неполярных (и, следовательно, гидрофобных) аминокислот, способных к формированию трансмембранного домена. В оригинальной модели АХР, предложенной Нума с коллегами[9], были идентифицированы четыре такие области (M1–M4, см. рис. 3.2), и была предложена структура, представленная на рис. 3.3. Используя индекс гидрофильности аминокислот в M1–M4 областях, можно самостоятельно проверить аргументированность этих заключений. Согласно последним данным, все трансмембранные участки, за исключением M2, являются скорее β, чем α-спиралями (см. рис. 3.4A).

Как узнать, какая часть молекулы АХР является внеклеточной, а какая внутриклеточной? Прежде всего, на NH_2-конце находится относительно гидрофобный участок из 24 аминокислот (рис. 3.2 и 3.5). Эта сигнальная последовательность необходима для проникновения синтезированного в клетке белка АХР в поверхностную мембрану. Следовательно, NH_2-конец является внеклеточным. С этим согласуется тот факт, что два соседних цистеиновых остатка в позициях 192 и 193 ассоциированы с внеклеточным центром связывания АХ. Наконец, начальный внеклеточный сегмент составляет около половины от всей молекулы, что согласуется с известным распределением массы рецептора (см. рис. 3.1). Исходя из указанного четного числа трансмембранных участков, СООН-конец также является внеклеточным. Главные характеристики этой модели хорошо согласуются с другими наблюдениями. Например, в условиях плотной упаковки, АХР образуют димеры за счет дисульфидных связей между СО-ОН-концами δ-субъединиц. Показано также, что такие дисульфидные мостики являются внеклеточными[11, 12].

Структура и функция канала

Основной техникой сопоставления функции канала и его структуры является экспрессия ионных каналов в ооцитах *Xenopus* или в других клетках инъекцией соответствующей мРНК или трансфекцией ДНК с помощью векторов[13]. После этой процедуры можно производить запись электрических сигналов либо от фрагментов мембраны, содержащих одиночные каналы, либо регистрировать токи целой клетки (отображающие поведение

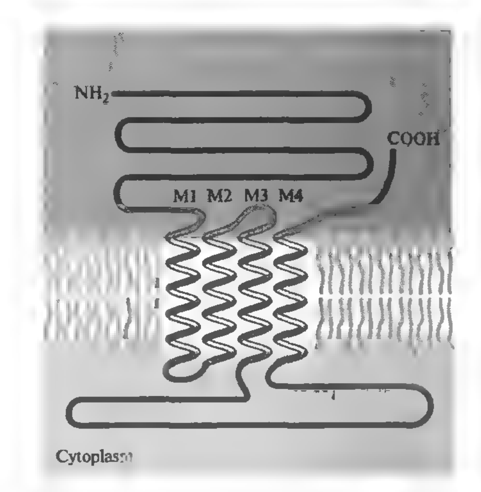


Рис. 3.3. Модель третичной структуры субъединицы АХР, предположенная из анализа аминокислотной последовательности этого белка. Каждый из участков M1–M4 образует трансмембранные спирали, а оба терминальных участка (COOH и NH_2) находятся во внеклеточном пространстве.

Fig. 3.3. Model of the Tertiary Structure of an AChR Subunit, as proposed originally from amino acid sequence analysis. Regions M1 through M4 each form membrane-spanning helices, and both the carboxy (COOH) terminus and the amino (NH_2) terminus of the peptide lie in the extracellular space.

всей популяции экспрессированных каналов). Этому помогает то, что интактные ооциты сами не экспрессируют АХР. Однако после введения нуклеиновой кислоты, кодирующей АХР, они не только экспрессируют соответствующие субъединицы белка, но даже чудесным образом обеспечивают их сборку в функционально активные рецепторно-канальные комплексы.

Структура ионного канала может быть изменена сайт-направленным мутагенезом. Для осуществления этой методики необходимо сконструировать мутантную кДНК с мутациями, меняющими какой-либо сайт белка ионного канала. Это позволяет добиться того, что выбранные аминокислоты с присущими им физико-химическими свойствами (положительным или отрицательным зарядом, высокополярные или неполярные) заменяются другими аминокислотами с отличающимися свойствами. Функциональные свойства мутантных каналов могут затем быть изучены после экспрессии этого белка в клетках, в которые была введена мутантная кДНК.

Эмбриональный и взрослый типы АХР в мышце млекопитающих

По мере развития скелетной мышцы свойства АХР могут изменяться за счет замены эмбрионального типа на взрослый тип АХР. Эмбриональная форма рецептора отличается от взрослой формы АХР более продолжительным временем, которое ионный канал проводит в открытом состоянии, и меньшей проводимостью. В основе изменения свойств рецептора лежит то, что γ-субъединица, характерная для эмбрионального АХР, заменяется ε субъединицей с иной аминокислотной последовательностью[14]. Эта связь изменений кинетики ионного канала и его проводимости с набором субъединиц, образующих АХР, подтверждена многочисленными экспериментами по инъекции различных комбинаций мРНК, кодирующей разные субъединицы АХР[15]. Ооциты, инъецированные мРНК для α-, β-, γ- и δ-субъединиц, экспрессируют ионные каналы эмбрионального типа. После инъекции мРНК для α-, β-, ε- и δ-субъединиц, экспрессируются каналы со свойствами, подобными АХР в зрелой мышце.

Какие субъединицы АХР выстраивают пору?

Для получения информации об устройстве выстилки поры ионного канала был активно использован сайт-направленный мутагенез субъединиц АХР. Несмотря на наличие общих представлений о третичной структуре субъединиц АХР, наши знания о точном топологическом расположении трансмембранных сегментов и их участии в формировании стенки ионного канала гораздо более поверхностны. Такие характеристики исключительно важны, поскольку структура поры определяет ионную избирательность и проводимость канала. Один из подходов к решению данной проблемы состоит в проведении одной или нескольких мутаций в участке белка, предположительно вовлеченном в выстилку поры, и регистрации следующих за этим изменений избирательности и проводимости канала.

Другой подход может базироваться на способности стенки ионного канала связывать молекулы с определенными физико-химическими свойствами. Например, молекула местного анестетика QX–222 может блокировать ток через ионный канал за счет связывания с определенным сайтом внутри открытого канала АХР. Мутации субъединиц АХР показали, что М2 домены формируют часть стенки открытого канала[16], как изображено на рис. 3.4А. В частности, М2 домены α- и δ-субъединиц АХР мыши содержат следующие аминокислотные последовательности (направление от цитоплазмы к внеклеточной среде, с нумерацией, относящейся к α-субъединице; рис. 3.2):

```
   243     250     255     261
α: M T L S I S V L L S L T V F L L V I V
δ: T S V A I S V L L A Q S V L L L I S
```

Можно предположить, что гидрофильные аминокислоты, такие как серин (S) или треонин (T), скорее всего обращены к водной поре, в то время как гидрофобный изолейцин (I) будет более вероятно контактировать с мембранными липидами. Когда серин из указанных позиций (отмечено подчеркиванием) был заменен слабо гидрофобным аланином, проводимость модифицированных ионных каналов снизилась почти наполовину. Кроме того, у мутантных каналов резко снизился аффинитет для QX–222. Эти эффекты согласуются с идеей о том, что серин образует стенку водной поры ионного канала АХР и вносит вклад в функциональные свойства ионного канала.

Предполагается, что все выделенные на приведенном рисунке аминокислоты в составе α-субъединицы принимают участие в образовании контура водной поры. Эти остатки были идентифицированы в экспериментах Карлин с коллегами[17], в которых каждый аминокислотный остаток α-субъединицы от M243 до V261 по очереди заменяли на цистеин. Мутантная α-субъединица была затем экспрессирована в ооциты вместе с интактными β-, γ- и δ-субъединицами. Мембранные токи, продуцируемые АХ, измерялись до и после действия гидрофильного реагента MTSEA (этиламмония метанэтиосульфонат). Реагент мог избирательно реагировать с сульфгидрильной группой цистеина только в том случае, если замещенный цистеин находился в водной фазе. MTSEA ослаблял ответы на АХ (за счет блока ионного канала) в тех случаях, когда мутациям подвергались аминокислоты, выделенные на рисунке (T244, L245, S248, L250, L251, S252, V255, L258). Эти результаты предполагают модель устройства стенки водной поры, образованной регулярной спиралью белковой молекулы, прерванной в середине вытянутой структурой, содержащей остатки 250, 251 и 252.

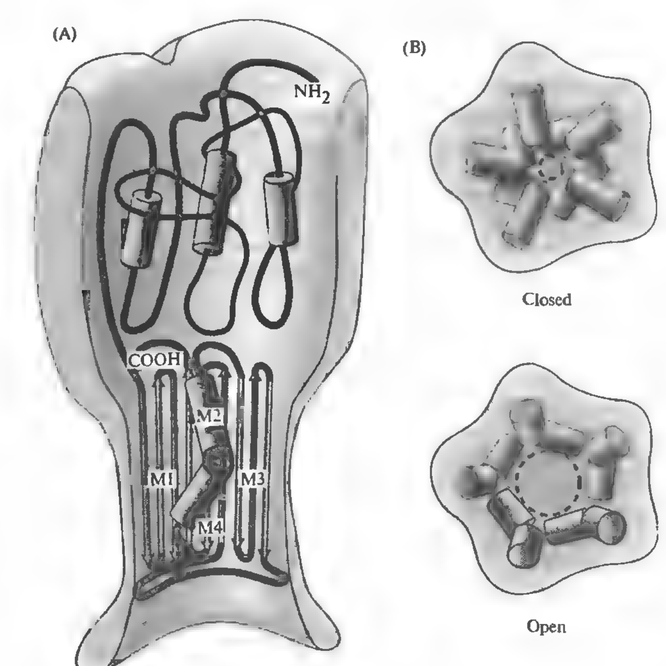


Рис. 3.4. Модель структуры субъединицы АХР, базирующаяся на электронно-микроскопическом изображении. (А) Три спиральных элемента находятся во внеклеточной части канала, окружая и формируя устье АХР, обращенное в синаптическую щель. В пределах плоскости мембраны участки M1, M3 и M4 образуют крупные β-спирали. M2 представляет собой изломанную мелкошаговую α-спираль, обращенную в просвет поры. (B) Поперечный срез рецептора, состоящего из пяти субъединиц.

Fig. 3.4. Proposed Model of the AChR Subunit Structure, based on electron microscope imaging. (A) Three helical elements lie within the extracellular region around the synaptic vestibule. Within the plane of the membrane, regions M1, M3, and M4 form a b sheet. M2 is a split a helix extending into the pore region. (B) Cross sections of the complete receptor, consisting of five subunits, in the plane of the membrane. In the closed receptor, the M2 helices extend into the core of the structure. An open pore is created by the rotation of each helix toward the channel wall. The model is not in agreement with biochemical experiments that suggest that the gate is closer to the cytoplasmic end of the pore.

Структура АХР с высоким разрешением

Эффективным подходом для изучения топологии ионных каналов является анализ изображения мембранного белка, полученного электронной микроскопией с высоким разрешением, как показано на рис. 3.1. Д. Анвин[18, 19], анализируя изображения АХР в везикулах из постсинаптических мембран *Torpedo*, достиг разрешения более чем 0,9 нм, раскрыв, таким образом, многие детали функционального устройства этого белка. Пять субъединиц по физическому устройству подобны друг другу, за исключением α-субъединицы, которая имеет «карман», обращенный в синаптическую зону, и служащий, вероятно, центром связывания АХ. Принципиальные характеристики структуры субъединиц АХР суммированы на рис. 3.4А. В каждой субъединице вокруг внеклеточной входной части АХР найдены три участка с плотной упаковкой в виде α-спиралей. Их физические позиции приблизительно такие, как показано на рисунке, но их очередность по отношению друг к другу пока неизвестна. Анализ среза изображения на уровне мембраны указывает на то, что в этой области каждая субъединица состоит только из одной спиральной структуры (вместо ранее предполагавшихся четырех) и обладает заметным изгибом в середине.

В полном рецепторе ансамбль из пяти центральных спиралей обрамлен кольцом плотного материала, образующим подобие звезды (рис. 3.4B). Предполагается, что центральные спирали являются формирующими пору M2 участками, а окружающее кольцо — β-спирали оставшихся 15 трансмембранных доменов (три в каждой субъединице). По расчетам, окружность звездчатого кольца составляет приблизительно 20 нм, что близко к размерам, полученным при анализе изображений, зарегистрированных методом электронной дифракции.

Открытое и закрытое состояния АХР

На рис. 3.4А представлена одна из α-субъединиц закрытого АХР, в котором изогнутый М2 участок вдается в пору. Для того чтобы получить изображение открытого АХР, Unwin апплицировал АХ в течение 5 мс перед быстрым замораживанием, захватывая, таким образом, рецепторы в открытом состоянии[19]. Это достигалось быстрым нанесением АХ на АХР-содержащие везикулы, которые сразу после этого падали в жидкий азот.

Сравнение изображений, полученных без АХ и после действия этого медиатора, показывает, что связывание АХ вызывает вращательное движение спиралей во внеклеточных участках АХР, что передается, по-видимому, на М2 спирали. Каким бы ни был механизм, в М2 спиралях появляется вращательное движение, направленное на перемещение этих участков от центра (см. рис. 3.4В), что в конечном счете приводит к открытию ионного канала АХР.

Точная локализация воротного механизма пока не определена. На основании структурных данных можно предположить, что ворота расположены вблизи изгиба М2 спирали, возможно, соответствуя лейцину в позиции 251 (L251)[19]. Однако, эксперименты Karlin и коллег на мутантных каналах, экспрессированных в ооцитах, позволяют предположить, что ворота располагаются гораздо ближе к цитоплазматическому концу спирали[20]. Эти авторы нашли, что добавленный во внеклеточный раствор водорастворимый блокирующий реагент MTSEA проходил закрытую пору до глубины, соответствующей треонину в позиции 244 (Т244). Если же MTSEA добавлялся с цитоплазматической стороны, он практически не мог проникнуть в закрытый ионный канал АХР.

Разнообразие субъединиц нейронального АХР

После установления аминокислотной последовательности никотинового АХР подобные подходы по изоляции и секвенированию были предприняты по отношению субъединиц никотиновых АХР из вегетативных ганглиев и ЦНС. Эти рецепторы получили название «нейрональные никотиновые рецепторы». Субъединицы, аналогичные α-субъединице мышечного рецептора, были идентифицированы по присутствию соседних цистеиновых остатков в проксимальной части NH_2 конца (позиции 192 и 193 на рис. 3.2). Другие субъединицы были определены как "β". Вместе с α-, β-, γ-, δ- и ϵ-субъединицами электрических органов и мышц эти субъединицы формируют **семейство** общего генетического происхождения.

Из мозга цыпленка и крысы были изолированы 11 субъединиц[21, 22]: $\alpha 2$, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, а также $\beta 2$, 3 и 4. Инъекция в ооциты мРНК для $\alpha 2$, $\alpha 3$ или $\alpha 4$ субъединиц с $\beta 2$ или $\beta 4$ приводила к формированию функциональных каналов[23]. Каналы, формирующиеся из 2 или более типов субъединиц, принято называть **гетеромультимерными**. Экспрессия только лишь $\alpha 7$ субъединиц является достаточным для формирования **гомомультимерных** ионных каналов[22]. Это же верно и для $\alpha 8$ или $\alpha 9$ субъединиц. Наличие большого семейства субъединиц, пригодных для формирования канала, предполагает, что они могут быть специфическим образом скомбинированы, формируя разнообразные варианты ионных каналов с отличающимися функциональными свойствами, такими как ионная избирательность, проводимость и кинетические параметры.

Субъединичная композиция нейрональных АХР

Какое количество субъединиц необходимо для формирования нейронального АХР? Это было определено мутациями α- и β-субъединиц АХР цыпленка, менявшими в результате модификации проводимость ионного канала[24]. Совместная инъекция в ооциты кДНК для нормальной и мутантной α-субъединицы вместе с кДНК, кодирующей нормальную β-субъединицу, давала в результате три различных типа проводимости канала. Один из них был таким же, как проводимость обычных каналов, другой — таким же, как у каналов, кодированных только мутантной кДНК. Третий тип проводимости, по всей видимости, был представлен каналами с одной нативной и одной мутантной α-субъединицей. По наличию одного (и только одного) промежуточного типа было сделано заключение, что обычный АХР содержит две α-субъединицы. Вследствие инъекции нормальной и мутантной β-субъединицы возникли каналы с четырьмя типами проводимости, указывающие на наличие трех не α-субъединиц. На основании этих экспериментов было сделано заключение о том, что нейрональный АХР представляет собой пентамер со стехиометрией $(\alpha)_2(\beta)_3$.

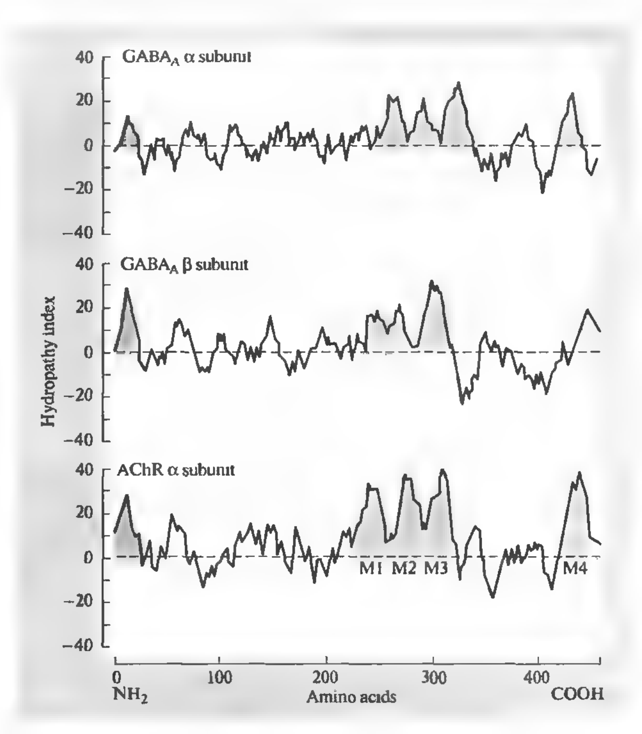


Рис. 3.5. Гидропатические индексы для аминокислотных последовательностей α и β-субъединиц GABA рецептора и одной субъединицы АХР. Положительные отклонения соответствуют гидрофобным аминокислотам, а отрицательные значения — гидрофильным остаткам.

Fig. 3.5. Hydropathy Indices for the amino acid sequences of the GABA$_A$ α and β subunits and the AChR subunit. Indices are calculated by taking a moving sum of the individual indices of adjacent amino acids in the sequence. Regions in the positive range are hydrophobic, those in the negative range hydrophilic. Light grey indicates principal hydrophobic regions; the four areas in similar positions toward the carboxy terminus correspond to the M1 through M4 regions of the ACh receptor. Dark grey regions are signal sequences. (Amino acid numbering includes the signal sequence on the amino terminus.) (After Schofield et al., 1987.)

§ 2. Суперсемейства рецепторов

ГАМК, глициновые и 5-НТ рецепторы

Три типа анионных (хлоридных) ионных каналов являются посредниками синаптического торможения в нервной системе. Все три типа каналов активируются аминокислотами: рецепторы типа А и типа С активируются γ-аминомасляной кислотой (ГАМК$_А$[25, 26] и ГАМК$_С$[27] рецепторы) и глициновый рецептор (глиР) — аминокислотой глицином[28]. Каждый тип рецептора имеет несколько изоформ субъединиц, причем все они гомологичны субъединицам АХР. Например, для ГАМК$_А$ рецепторов идентифицировано шесть α-, три β-, три γ-, одна δ- и одна ϵ-субъединица. 5-НТ$_3$ рецептор для серотонина образует катионный канал с функциональными свойствами, подобными никотиновому АХР[29]. Была клонирована субъединица 5-НТ$_3$ рецептора, известная как СЕРα1[30]. По аминокислотному составу СЕРα1, как и субъединицы ГАМК и глицинового рецепторов, сходна с субъединицами никотинового АХР.

Хотя АХ и 5-НТ$_3$ рецепторы являются катион-избирательными, а ГАМК и глициновый рецепторы — анион-избирательными, сходство аминокислотных последовательностей в их субъединицах позволяет предположить, что все четыре семьи рецепторов имеют общее генетическое происхождение. Вместе они образуют общее генетическое **суперсемейство**[31]. Высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей предполагает, что структуры более высокого порядка также будут подобны. Свидетельство такого структурного подобия представлено на рис. 3.5, на котором сравнивается индекс водорастворимости последовательных аминокислот, входящих в состав двух субъединиц ГАМК$_А$ рецептора и α-субъединицы АХР. Как ясно следует из этого рисунка, все три пептида имеют сходные профили с четырьмя гидрофобными последовательностями между аминокислотными остатками 220 и 500, указывающие на сходные трансмембранные домены. Подобные гидропатические профили показаны и для субъединиц глицинового и 5-НТ$_3$ рецепторов. Таким образом, предполагаемая третичная структура субъединиц глицинового, ГАМК и 5-НТ$_3$ рецепторов аналогична таковой у субъединиц АХР (см. рис. 3.3).

Ионная избирательность лиганд-активируемых ионных каналов

Может вызвать удивление тот факт, что одно и тоже суперсемейство включает как катионные, так и анионные каналы. Каким образом селективность ионных каналов может различаться при столь очевидном структурном подобии? Одной из характерных черт строения ионных каналов является то, что их внемембранные части значительно выдаются над поверхностью мембраны (например, см. рис. 3.1). Unwin[32] отмечает, что в катионных каналах стенки выступающего вестибюля канала имеют избыточный отрицательный заряд, тогда как анионные каналы в этих местах заряжены избыточно положительно. Так как открытый канал имеет около 2 нм в диаметре, а эффективный радиус электростатического взаимодействия в физиологических растворах составляет около 1 нм, положительный заряд в вестибюле канала может способствовать аккумуляции в нем отрицательных ионов, например, хлоридов в устье глицинового рецептора. Наоборот, в катионном канале в отрицательно заряженном вестибюле могут накапливаться положительно заряженные натрий и кальций. Аккумуляция ионов в вестибюле может способствовать процессу отбора анионным каналом анионов, а катионным каналом — катионов. Надо учесть также, что аккумуляция ионов будет способствовать увеличению проводимости каналов (напомним, что проводимость канала зависит от концентрации ионов).

§ 3. Потенциал-активируемые каналы

К каналам, специфически активируемым деполяризацией клеточной мембраны, относятся потенциал-активируемые натриевые каналы, отвечающие за фазу деполяризации потенциала действия, и потенциал-активируемые калиевые каналы, ассоциированные с мембранной реполяризацией. В эту группу также входят потенциал-активируемые кальциевые каналы, которые в некоторых тканях отвечают за генерацию потенциала действия и поддержание длительной деполяризации, а также выполняют много других функций, таких как мышечное сокращение и освобождение нейротрансмиттеров. Каждое из этих трех семейств каналов имеет ряд изоформ, представленных у различных биологических видов и в разных частях нервной системы. Подобно АХР и его аналогам, они также составляют суперсемейство единого генетического происхождения.

Потенциал-активируемые натриевые каналы

Методы, которые были использованы для характеристики молекулярной структуры АХР, были также успешно применены к потенциал-активируемым каналам. Ключевыми шагами в этом процессе были биохимическая экстракция и изоляция протеина[33)–35)] с последующим выделением клонов кДНК и расшифровкой аминокислотной последовательности[36)]. Также как в случае АХР, электрические рыбы — на этот раз угорь *Electrophorus electricus* — явились богатым источником канального белка, а высокоаффинные токсины, такие как тетродотоксин (ТТХ) и сакситоксин (STX), обеспечили процесс изоляции протеина. Оба этих токсина блокируют ионную проводимость нативных каналов, закупоривая пору открытого канала. Позже натриевые каналы были изолированы из мозга и скелетной мышцы. Натриевый канал, выделенный из электрического угря, состоит из одного крупного (260 кД) пептида и является типичным представителем семейства структурно сходных протеинов.

В мозге млекопитающих ключевая 260 кД α-субъединица натриевого канала ассоциирована с двумя дополнительными субъединицами: β_1 (36 кД) и β_2 (33 кД). Показано, что присутствие β_1-субъединицы значительно повышает скорость инактивации натриевого канала[37)]. В мозге было найдено несколько различных вариантов мРНК, кодирующих α-субъединицу, что объясняет наличие разных подтипов натриевого канала. По крайней мере два дополнительных изоформы натриевого канала выделены из скелетной мышце млекопитающих — одна из взрослой мышцы (RSkM1)[38)], и другая, характерная для эмбриональной или денервированной мышцы (RSkM2)[39)]. Третья изоформа этого канала обнаружена в сердечной мышце

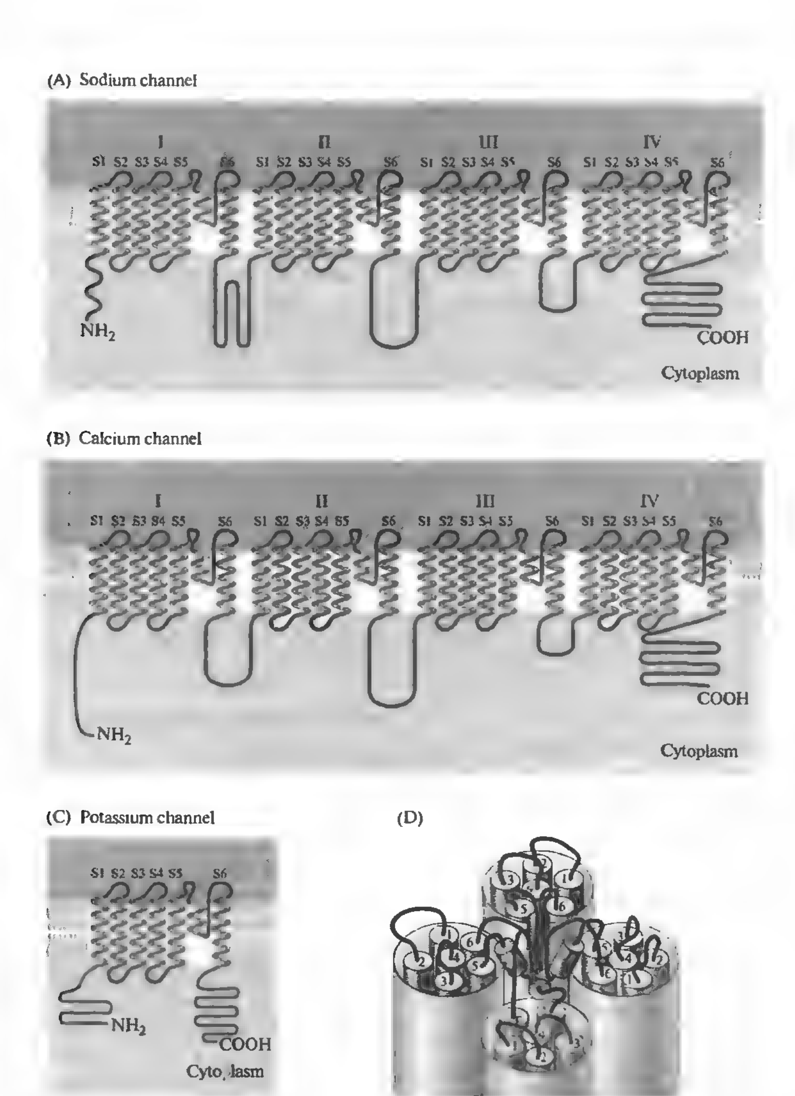


Рис. 3.6. Структура потенциал-активируемых каналов. (A) Потенциал-активируемые натриевые каналы, представляющие одну белковую молекулу с четырьмя доменами (I–IV), соединенными внутриклеточными петлями. Каждый домен имеет шесть трансмембранных участков (S1–S6). Структура, формирующая ионную пору, располагается между пятым и шестым сегментом. (B) Структура потенциал-активируемых кальциевых каналов подобна таковой натриевого канала. (C) Субъединица калиевого канала похожа на одиночный домен натриевого канала. (D) Предполагаемая трехмерная структура канала.

Fig. 3.6. Figure 3.6 Voltage-Activated Channel Structure. (A) Voltage-activated sodium channel, represented as a single protein with four domains (I–IV) connected by intracellular loops. Each domain has six transmembrane segments (S1–S6), with a pore-forming structure between the fifth and sixth. (B) The structure of voltage-activated calcium channels is similar to that of the sodium channel. (C) The potassium channel subunit resembles a single domain of the sodium channel. (D) The proposed three-dimensional channel structure, with the domains in a circular array and the S5–S6 connectors dipping into the pore. The relative positions of S1 through S6 in each domain are not known and thus are shown arbitrarily.

млекопитающих[40]. После трансляции происходит интенсивное гликозилирование канального белка. Так, около 30% массы натриевого канала угря составляют углеводы, содержащие большие количества сиаловой кислоты.

Аминокислотная последовательность и третичная структура натриевого канала

Натриевый ионный канал угря представляет собой пептид с последовательностью из 1832 аминокислот, в котором выделяют четыре следующих другом за другом домена (I–IV), каждый из которых содержит от 300 до 400 остатков. Эти домены имеют примерно 50%-ную гомологию аминокислотных последовательностей. Каждый домен является структурным эквивалентом одной субъединицы канальных белков семейства АХР. Однако в отличие от АХР все домены натриевого канала соединены вместе в единый белок. В пределах каждого домена есть множественные гидрофобные или смешанные гидрофобно/гидрофильные (амфотерные) последовательности, обеспечивающие формирование трансмембранных сегментов.

Согласно общепринятой модели топологии канала (рис. 3.6А) каждый домен имеет шесть таких трансмембранных сегментов (S1–S6). Так же как в случае АХР, домены натриевого канала располагаются кольцом вокруг поры ионного канала (рис. 3.6D). Особенно интересен сегмент S4, который имеется во всех четырех доменах и несет положительно заряженный аргининовый или лизиновый остаток в каждой третьей позиции трансмембранного сегмента. Предполагается, что это свойство обеспечивает чувствительность канала к электрическому полю и оно имеется у всех потенциал-активируемых ионных каналов (глава 6).

Потенциал-активируемые кальциевые каналы

Семейство потенциал-активируемых кальциевых каналов содержит несколько подтипов, которые были классифицированы по их функциональным свойствам, таким как чувствительность к деполяризации мембраны и продолжительность открытого состояния (табл. 3.1)[41, 42]. Изоформы кальциевых ионных каналов были клонированы из скелетной, сердечной и гладкой мышцы, а также из мозга. Аминокислотная последовательность первичной канал-формирующей субъединицы (α_1) подобна аналогичной субъединице потенциал-активируемого натриевого канала[43]. В частности, трансмембранные сегменты S1–S6 гомологичны таковым натриевого канала. На основании этого предполагается, что кальциевый и натриевый каналы имеют одинаковую третичную структуру (рис. 3.6В).

Хотя для формирования функционирующего кальциевого канала в чужеродных клетках достаточно только α_1-субъединицы, в нативных клеточных мембранах найдены три дополнительные субъединицы: $\alpha_2\delta$, димер с внеклеточным α_2-пептидом, связанным с трансмембранным δ-пептидом дисульфидной связью; β, внутриклеточный примембранный белок, и γ, интегральный белок с четырьмя трансмембранными доменами. Коэкспрессия различных комбинаций субъединиц позволила предположить, что $\alpha_2\delta$- и β-субъединицы влияют как на проводимость канала, так и на его кинетику, а γ-субъединица обеспечивает потенциал-чувствительность канала[44].

Потенциал-активируемые калиевые каналы

Потенциал-чувствительные калиевые каналы играют важную роль в процессах возбудимости и проводимости. Целый ряд разных генов кодирует разнообразные типы калиевых каналов. Первый калиевый канал, у которого была установлена аминокислотная последовательность, был выделен у *Drosophila*. Он был назван Shaker по генетическому мутанту, у которого был обнаружен дефект этого канала[45]. Особенность этих мутантных мушек заключалась в том, что они трепетали (shaking), когда для их подсчета их анестезировали эфиром. Столь легко распознаваемая мутация обеспечила удобный методический подход для клонирования этого калиевого канала, не требующий обязательной идентификации белка. Генетический анализ позволил установить область примерного расположения гена Shaker в геноме *Drosophila*. Последующее сопоставление нормальной и мутантной последовательностей в этой области привело к идентификации гена *shaker*.

Неожиданным было то, что аминокислотная последовательность полученного белка оказалось намного короче таковой у потенциал-активируемого натриевого или кальциевого канала. Пептид калиевого канала содержал

Таблица 3.1. Функциональная классификация потенциал-зависимых кальциевых каналов и соответствующие клоны субъединиц.

Table 3.1. Functional classification of voltage-activated calcium channels and corresponding clones of a subunits.

Type[a]	Threshold[b]	Inactivation	Clone	Alternative designation	Tissue source
T	LV	Yes	—	—	—
L	HV	No	S	CaCh1	Skeletal muscle
—	—	—	Ca, Cb[c]	CaCh2a, CaCh2b	Brain and heart
—	—	—	D	CaCh3	Brain
P	HV	Slow	A	CaCh4	Brain
Q	HV	Slow	—	—	—
N	HV	Yes	B	CaCh5	Brain
R	HV	No	E	CaCh6	Brain

[a] Designations T, L, and N originally meant Transient, Long-lasting, and Neither T nor L; P refers to Purkinje cells.

[b] HV and LV indicate high-voltage and low-voltage thresholds for opening.

[c] Lowercase designations a and b indicate splice variants.

только один домен (см. рис. 3.6B), подобный IV домену натриевого канала угря. Экспериментальные данные указывают на то, что в мембране отдельные субъединицы калиевого канала объединяются, формируя мультимерные ионные каналы[46]. У *Drosophila* были клонированы четыре отдельных подсемейства калиевых каналов (названные Shaker, Shab, Shaw, Shal). У млекопитающих найдены аналоги для всех этих типов (табл. 3.2). Каждое подсемейство представлено различными изоформами (Shaker1, Shaker2 и т. д.). Изоформы одного и того же подсемейства после экспрессии способны формировать гетеромультимерные каналы, тогда как изоформы, принадлежащие разным подсемействам, такой способностью не обладают[47].

Подобно натриевому и кальциевому каналам, потенциал-активируемые калиевые каналы обычно экспрессируются вместе с дополнительными (β) субъединицами[48]. Идентифицировано два подсемейства этих дополнительных субъединиц: Kvβ1.1–Kvβ1.3 и Kvβ2.1. Экспрессированные с основными субъединицами, β-субъединицы определяют потенциал-чувствительность и инактивационные свойства калиевых каналов.

Сколько субъединиц в калиевом канале?

Сравнение структуры калиевого канала со строением родственных натриевого и кальциевого каналов (рис 3.6) позволило высказать предположение, что полноценный калиевый канал представлен ансамблем четырех субъединиц (тетрамером). Для изучения этого вопроса были проведены эффектные эксперименты с блокатором калиевого канала charybdotoxin (CTX) в сочетании с использованием мутантов, резистентных к данному токсину[49]. Субъединицы нативного и мутантного типов калиевого канала Drosophila были экспрессированы в ооцит в разных пропорциях. При использовании только нативных субъединиц калиевого канала, формирующих гомомультимерные каналы, калиевые токи в мембране ооцита полностью блокировались высокими концентрациями CTX. Мутантные каналы при этом практически не блокировались.

Таблица 3.2. Гены субъединиц потенциал-зависимого калиевого канала у дрозофилы и соответствующие гены млекопитающих.

Table 3.2. Voltage-activated potassium channel subunit genes in Drosophila, and corresponding mammalian genes.

Drosophila gene	Mammalian genes
Shaker 1 to 12	Kv 1.1 to 1.12
Shab 1 and 2	Kv 2.1 and 2.2
Shaw 1 to 4	Kv 3.1 to 3.4
Shal 1 and 2	Kv 4.1 and 4.2

Токи в ооцитах, инъецированных как мутантной, так и нативной мРНК, блокировались лишь частично.

Для трактовки этих экспериментов ключевое значение имел тот факт, что связывание СТХ даже одной субъединицей канала уже достаточно для блокирования всего канального комплекса и прекращения тока. Следовательно, в ооцитах, инъецированных смесью нативного и мутантного типов, незатронутыми токсином останутся только гомомультимерные каналы, образованные исключительно мутантными субъединицами. Фракция таких каналов, сформированных случайной ассоциацией субъединиц нативного и мутантного типов, может быть подсчитана по соотношению количества инъецированной мРНК для мутантного и нативного типов канала. Например, если канал состоит из четырех субъединиц и 90 % РНК является мутантной, то вероятность формирования каналов, состоящих только из мутантных субъединиц, составит ($[0,9]^4$), или 66 %. Оставшиеся 34 % каналов будут иметь по меньшей мере одну субъединицу нативного типа и будут подвержены блокирующему действию токсина. Аналогичный подсчет предсказывает, что блокирующий эффект СТХ должен составить 27 % для каналов-тримеров (каналов, состоящих из 3 субъединиц) и 41 % для пентамеров (5 субъединиц). Поскольку в указанных экспериментах наблюдалось блокирование каналов на 34 %, удивительно совпадающее с предсказанием, было сделано заключение о тетрамерной структуре калиевых каналов.

Строение поры потенциал-активируемых каналов

Общим признаком аминокислотных последовательностей всех потенциал-активируемых каналов является умеренно гидрофобный участок во внеклеточной петле между S5 и S6 сегментами (рис. 3.6). Так же как в экспериментах, описанных ранее для M2 участка АХР, мутации в этом участке калиевого канала Shaker снижали сродство канала для блокирующего действия тетраэтиламмония (ТЕА) и изменяли проводимость канала[50, 51]. Было сделано заключение, что этот участок погружен вглубь канала и принимает участие в формирования ионной поры[52]. Этот вывод подтверждался также данными рентгеновской дифракции канала (см. рис. 3.7). Петля S5–S6 формирует короткую спираль, которая погружена в центр канала; аминокислоты, восходящие от нижнего конца спирали, образуют верхнюю часть ионной поры (см. рис. 3.6D).

Мутации в области поры существенно затрагивают ионную избирательность потенциал-активируемых ионных каналов. Например, в натриевых каналах мозга крысы замена в области поры в третьем домене положительно заряженного глутамата на отрицательно заряженный лизин приводит к появлению характеристик, свойственных кальциевым каналам[53]. Вместо селективной проницаемости для натрия мутантный канал имеет низкую избирательность для моновалентных катионов. Кроме того, при физиологических концентрациях ионов, большая часть тока через такой канал обеспечивается кальцием.

Анализ структуры калиевого канала с высоким разрешением

Структура калиевых каналов Streptomyces lividans ($K_{CS}A$ каналы) была изучена рентгеновской кристаллографией с разрешением 3,2 Å[54]. Бактериальные каналы относятся к классу калиевых каналов, субъединицы которых вместо шести трансмембранных доменов имеют только два. Другим примером такого двух-доменного белка является калиевый канал внутреннего выпрямления, который будет обсуждаться позже (см. рис. 3.8). Два сегмента калиевого канала являются структурными эквивалентами сегментов S5 и S6 в потенциал-активируемых каналах. Несмотря на разное число трансмембранных сегментов, аминокислотная последовательность в пору-формирующей петле S5–S6 удивительно консервативна у всех калиевых каналов[53, 55]. Преимуществом исследования бактериального калиевого канала является то, что он может быть продуцирован в больших количествах, достаточных для кристаллизации, что делает возможным проведение рентгеновской дифракции.

$K_{CS}A$ канал является тетрамером. Рис. 3.7 предстааляет канал в разрезе и показывает большую часть его структурных деталей. Рядом с NH_2-концом каждой субъединицы имеется наружная спираль, которая пронизывает мембрану от цитоплазматической стороны до наружной поверхности. За наружной спиралью следует короткая спираль, направленная в пору. Затем располагается внутренняя спираль, которая возвращается к цитоплазматической стороне. Соединяющие петли меж-

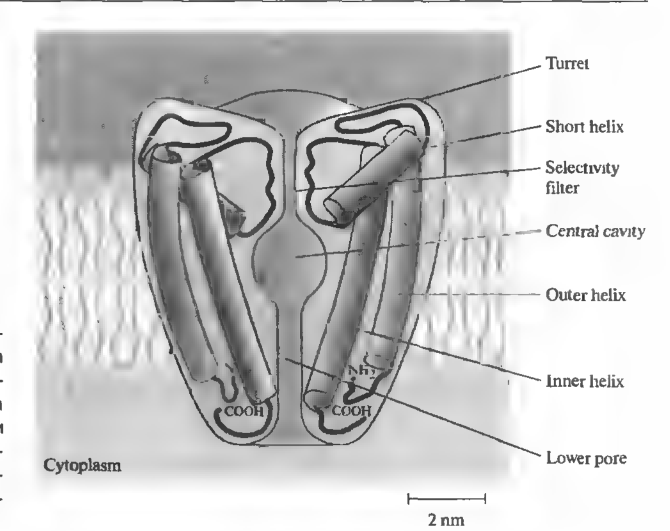


Рис. 3.7. Структура калиевого канала. Поперечный срез калиевого канала $K_{SC}A$ типа, показывающий две из четырех субъединиц. Каждая субъединица имеет две трансмембранных спирали и короткую спираль, обращенную в пору. Петли, идущие от короткой спирали, образуют селективный фильтр канала.

Fig. 3.7. Potassium Channel Structure. Sectional view of a $K_{SC}A$ potassium channel, showing two of four subunits, one on either side of the central pore. Each subunit has two membrane-spanning helices and a short helix pointing into the pore. The connections between the outer helices and the short helices of the four subunits form four turrets that surround the pore entrance and contain binding sites for blocking molecules. The four connections between the short helices and the inner helices combine to form the selectivity filter, which allows the permeation of potassium, cesium, and rubidium but excludes smaller cations such as sodium and lithium. (After Doyle et al., 1998.)

ду наружной и короткой спиралями образуют четыре возвышения, окружающие наружное отверстие поры и содержащие связывающие сайты для ТЕА и других блокирующих канал токсинов[53]. В каждой субъединице петля между центральным концом короткой спирали и внутренней спиралью формирует структуру ионной поры. Четыре такие петли, объединяясь, образуют узкий проход, ответственный за ионную избирательность канала — селективный фильтр. Относительно большая центральная полость и нижняя внутренняя пора соединяют селективный фильтр с цитоплазмой.

Избирательность для калия достигается как размером, так и молекулярным строением селективного фильтра. Диаметр фильтра составляет около 0,3 нм и аминокислоты в его стенке ориентированы таким образом, что последовательные кольца, образованные четырьмя карбоксильными группами (по одной от каждой субъединицы), обращены внутрь поры. Диаметр поры достаточен для прохождения дегидратированного иона калия (диаметром около 0,27 нм). Следует заметить, что дегидратация проникающего иона могла бы потребовать значительной энергии (глава 2). Однако этот фактор минимизируется за счет кислорода стенки канала, который заменяет атомы кислорода воды в гидратированной молекуле. Ионы меньшего размера, такие как натрий (диаметр 0,19 нм) или литий (диаметр 0,12 нм), не способны проникнуть через калиевый канал, поскольку они не могут сформировать достаточно плотный контакт одновременно со всеми четырьмя кислородами, поэтому они остаются гидратированными. Ионы большего размера, такие как цезий (диаметр 0,33 нм), не могут проникнуть через пору из-за своих размеров. Эти структурные основы ионной избирательности вполне согласуются с традиционными воззрениями на ионную проницаемость каналов[56].

Исследователи надеются, что метод рентгеновской дифракции сможет обеспечить новыми данными о пока еще малоизученных структурных изменениях, происходящих при открытии ворот калиевого канала. Например, загадкой является локализация ворот, поскольку в калиевых каналах Shaker приложенные с цитоплазматической стороны вещества имеют при открытом канале свободный доступ вглубь поры, хотя тогда, когда каналы закрыты, они могут проникать внутрь канала только на очень короткую дистанцию. Следовательно, ворота должны находиться совсем рядом со входом, с цитоплазматической стороны ионной поры[57].

§ 4. Другие каналы

Помимо перечисленных ранее, в нейронах имеется еще довольно много иных ионных каналов, принципиально важных для функционирования нервной системы. Для многих из этих каналов были определены детали их молекулярного устройства. Среди них представлено семейство глутамат-активируемых каналов, семейство АТФ-активируемых каналов и многие другие. Клонированы представители большого семейства потенциал-активируемых хлорных каналов, а также определены аминокислотные последовательности субъединиц, формирующих потенциал-чувствительные калиевые каналы внутреннего выпрямления. Кроме того, установлены структуры ионных каналов, активируемых внутриклеточными лигандами.

Главной закономерностью, установленной к настоящему времени, является то, что для формирования ионного канала необходим, как правило, ансамбль четырех или более белковых субъединиц (или в случае потенциал-активируемых натриевых и кальциевых каналов — наличие четырех повторяющихся доменов одного белка). Во многих случаях реальное число субъединиц, образующих канал, зачастую остается неизвестным, хотя для потенциал-чувствительных каналов и катионных каналов, активируемых внутриклеточными лигандами, предполагается тетрамерная структура. В отличие от этого, для каналов, активируемых внеклеточными лигандами, общепринятым считается наличие пяти субъединиц. Далее приведены некоторые примеры таких каналов.

Потенциал-активируемые хлорные каналы

Впервые потенциал-активнруемые хлорные каналы были клонированы из электрического органа *Torpedo*[58]. Известные как CLC–0 каналы, они с высокой плотностью экспрессированы в неиннервированной части клеток этого органа, предоставляя собой низкоомный путь распространения токов, генерируемых в иннервированной области клетки. Ген, кодирующий CLC–0, обнаружен также в мозге млекопитающих и относится к большому семейству, которое включает, по меньшей мере, восемь других гомологичных генов[59]. CLC–1 хлорные каналы, найденные в скелетной мышце млекопитающих, вносят ведущую роль в проводимость мембраны мышечных волокон. В частности, они стабилизируют заряд мембраны на уровне потенциала покоя. CLC–2 каналы ассоциированы с регуляцией объема клетки и обладают чувствительностью к растяжению мембраны. Две другие изоформы хлорных каналов, CLC-K1 и CLC-K2, отвечают за реабсорбцию хлорида в почках.

До сих пор остаются некоторые неясности в трансмембранной топологии хлорных каналов CLC, что в значительной мере зависит от различной трактовки гидропатического анализа аминокислотной последовательности белка канала[60]. CLC каналы состоят из 13 гидрофобных доменов, 11 из которых с высокой вероятностью расположены внутри мембраны (рис. 3.8). Особенностью этих хлорных каналов является наличие протяженного гидрофобного участка D9–D10, конфигурация которого в мембране пока неизвестна. Экспериментальные данные позволяют предположить, что CLC–0 функционирует в мембране как димер, необычным свойством которого является то, что каждая субъединица формирует в мембране свой собственный независимый канал[61].

Калиевые каналы внутреннего выпрямления

Калиевые каналы внутреннего выпрямления (K_{ir} каналы) обеспечивают движение ионов калия в клетку тогда, когда мембранный потенциал отрицателен по отношению к равновесному потенциалу калия, хотя они практически не поддерживают движения калия наружу клетки. Имеется по крайней мере пять подсемейств канала $K_{ir}1$–$K_{ir}5$, обнаруженных в мозге, сердце и почках[62, 63]. Одно семейство, $K_{ir}3$, формирует каналы, активируемые внутриклеточными G-белками (глава 10). Эти каналы могут быть заблокированы внутриклеточным магнием и/или внутриклеточными полиаминами. Предполагаемая структура субъединиц K_{ir} (рис. 3.8B) подобна таковой у канала $K_{CS}A$ с двумя трансмембранными доменами. Магний-связывающий сайт, блокирующий активность K_{ir} каналов, располагается предположительно на M2 домене в области цитоплазматического конца канала.

АТФ-активируемые каналы

Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) выполняет функцию нейротрансмиттера в гладкомышечных клетках, в клетках автономных ганглиев и в нейронах центральной нервной

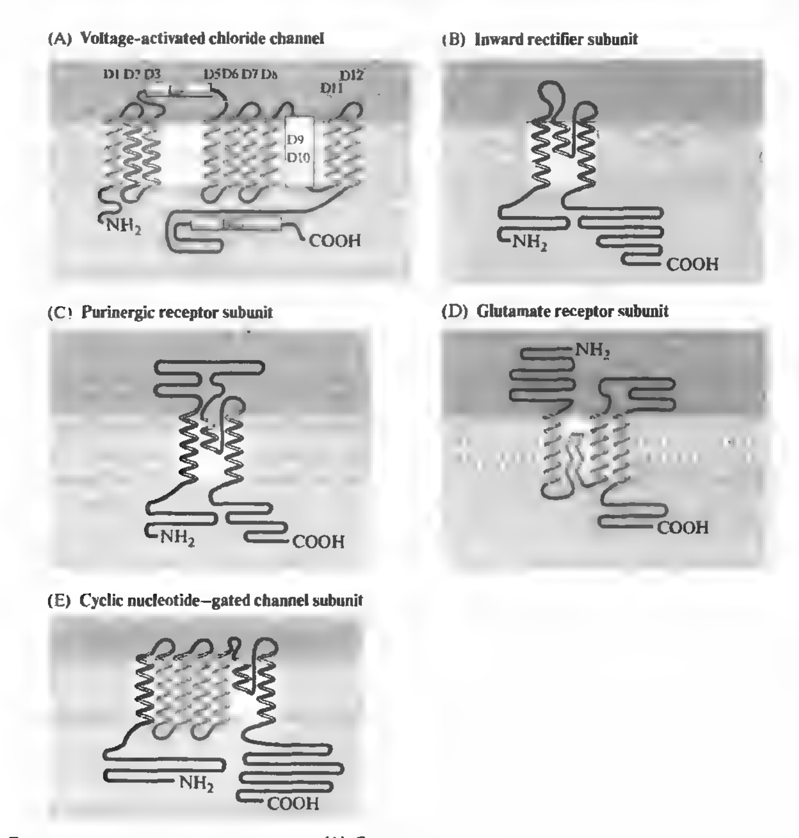


Рис. 3.8. Примеры отдельных типов каналов. (А) Белок потенциал-активируемого хлорного канала предположительно имеет 11 трансмембранных участка. Димеры этого канала в мембране образуют два независимых канала. (В) Вторичная структура калиевого канала входного выпрямления с двумя трансмембранными доменами петлей, образующей пору. Полный канал, по-видимому, тетрамер. (С) Структура АТФ рецептора сходная со структурой канала входного выпрямления. (D) Субъединица глутаматного рецептора с тремя трансмембранными спиралями и образующая пору петля, исходящая с цитоплазматической стороны. Полный канал, по-видимому, пентамер. (Е) Строение субъединицы канала, активируемого цАМФ или цГМФ, подобно строению потенциал-активируемого калиевого канала (рис. 3.6) Полный канал, по-видимому, тетрамер.

Fig. 3.8. Examples of Distinctive Types of Channels. (A) The voltage-activated chloride channel protein is thought to have 11 membrane-spanning regions; the arrangement of segment D9–D10 is not known. The protein is believed to assemble in the membrane as a dimer to form a "double-barreled" channel structure. (B) Proposed secondary structure of a subunit of the inward-rectifying potassium channel, with two membrane-spanning regions and a pore-lining loop. The complete channel is assumed to be a tetramer. (C) The subunit structure of receptors for ATP appears similar to that of the inward rectifier. (D) Glutamate receptor subunits are believed to have three transmembrane helices and a pore-forming loop entering the channel from the cytoplasmic side. The complete receptor is thought to be a pentamer. (E) The subunit structure of channels activated by cyclic AMP or cyclic GMP is similar to that of voltage-activated potassium channels (see Figure 3.6C). Complete channels are assumed to be tetramers.

системы[64, 65]. Так как АТФ является пурином, его рецепторные молекулы известны как пуринергические рецепторы. Один из них P2X рецептор, лиганд-активируемый катионный канал. Клонировано семь субъединиц P2X рецептора ($P2X_1$–$P2X_7$)[66]. Их предполагаемая третичная структура (рис. 3.8С) с двумя трансмембранными участками подобна таковой у субъединиц канала $K_{CS}A$.

Глутаматные рецепторы

Глутамат является наиболее важным и наиболее распространенным возбуждающим нейротрансмиттером центральной нервной систе-

мы, активирующим, по меньшей мере, три типа катионных каналов. Все три типа рецепторно-канальных комплексов обладают различными функциональными свойствами и отличаются друг от друга по чувствительности к разным аналогам глутамата[67]. Один из рецепторов, называемый NMDA-рецептор, избирательно отвечает на N-methyl-D-aspartate (NMDA). Два других рецептора активируются соответственно AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) или каинатом. Благодаря избирательности, три этих агониста (NMDA, AMPA, каинат) являются важными экспериментальными инструментами для селективной активации соответствующего типа глутаматного рецептора. При этом следует помнить, что естественным трансмиттером для всех трех типов рецепторов является только глутамат, но не его аналоги.

Молекулярное клонирование позволило идентифицировать кДНК для 16 субъединиц глутаматного рецептора. Пять из этих субъединиц, названные NR1 и NR2, могут принимать участие в формировании NMDA-рецептора. AMPA-рецепторы сформированы другими типами субъединиц, обозначаемых как GluRA–GluRD (или GluR1–GluR4). Каинатные рецепторы собраны из субъединиц KA1 и/или KA2 в комбинации с GluR5, 6 или 7. Для двух гомологичных субъединиц глутаматного рецептора, δ_1 и δ_2, принадлежность к какому-либо отдельному рецептору остается пока не установленной. По аналогии с никотиновым AXP считается, что глутаматные каналы являются также пентамерами, хотя на этом подобие между ними заканчивается. Аминокислотная последовательность субъединиц глутаматного рецептора[68]–[70] примерно вдвое длиннее таковой суперсемейства, включающего AXP, 5-HT_3, ГАМК и глициновые рецепторы. Кроме того, между двумя этими суперсемействами практически нет гомологии.

Поскольку субъединицы глутаматного рецептора имеют четыре трансмембранных сегмента, поначалу считали, что они располагаются в мембране так же, как у AXP (см. рис. 3.3). Однако последние данные позволяют представить строение глутаматных каналов так, как это изображено на рис. 3.8D. Согласно этому представлению, второй сегмент вступает в мембрану с цитоплазматической стороны, образуя петлю-шпильку, выстилающую пору. Эта уникальная для глутаматного рецептора конфигурация подтверждается и данными мутагенеза данной петли ионного канала[72].

Каналы, активируемые циклическими нуклеотидами

Рецепторы сетчатки и обонятельного эпителия активируются внутриклеточным циклическим АМФ или циклическим ГМФ[73, 74]. Рецепторы формируют ионные каналы, с различной избирательностью для калия, натрия или кальция. Аминокислотная последовательность субъединиц нуклетид-активируемых ионных каналов имеет некоторую гомологию с субъединицами потенциал-чувствительных каналов. Предполагаемая структура каналов (рис. 3.8E) включает шесть трансмембранных участков, что хорошо согласуется с гидропатическими индексами этих белков. Участок S4 представлен регулярно повторяющимися заряженными остатками, хотя число их ниже, чем у потенциал-чувствительных каналов. В соответствии с активацией внутриклеточными лигандами, большая часть массы белка канала находится на цитоплазматической стороне мембраны. Наиболее вероятной формой объединения субъединиц является тетрамер.

§ 5. Разнообразие субъединиц

Характерной особенностью ионных каналов является широкое разнообразие изоформ субъединиц. Существует больше дюжины вариантов субъединиц никотинового AXP и еще большее число субъединиц калиевого канала и глутаматного рецептора. Как возникает такое разнообразие? В основе этого лежит прежде всего то, что каждый канал или субъединица канала кодированы отдельным геном. Кроме того, установлены два других механизма, приводящих к появлению субъединиц с различающими свойствами.

Во-первых, это **альтернативный сплайсинг.** Большинство белков кодированы в различных сегментах ДНК, так называемых экзонах. В некоторых случаях экзоны вместо комбинации в единственный вариант мРНК, контролирующий синтез специфической субъединицы, образуют различные альтернативные комбинации, что приводит к созданию мРНК для множественных изоформ субъединиц. Во время транскрипции неизвестный регулирующий механизм определяет, какая из альтернативных мРНК будет использована для синтеза

белка. Остаток исключается из транскрипта и оставшиеся сегменты РНК соединяются, формируя конечную мРНК. Например, именно таким путем образуются изоформы калиевого канала типа Shaker.

Второй способ достижения разнообразия субъединиц — **редактирование РНК**. Примером являются субъединицы глутаматных рецепторов GluRB, GluR5 и GluR6. Эти субъединицы в середине второго трансмембранного сегмента содержат либо глютаминовый, либо аргининовый остаток (рис. 3.8D). Присутствие аргинина устраняет кальциевую проницаемость ионного канала и уменьшает его проводимость. Таким образом, хотя ДНК всех трех субъединиц для этого сайта содержит глютаминовый кодон (CAG), на уровне мРНК, в соответствующем участке может появиться кодон для аргинина (CGG)[75]. Это изменение в базовой последовательности нуклеиновых кислот достигается редактированием РНК в ядре клетки. Таким образом, например, редактируется процесс синтеза GluRB и отчасти синтез GluR5 и GluR6. В GluR6 дополнительное редактирование A/G найдено в первом трансмембранном сегменте[76].

Заключение

Современными методами биохимии, молекулярной и клеточной биологии, электронной микроскопии, электронной и рентгеновской дифракции получена детальная информация о молекулярной организации и структуре каналов и рецепторов. Мы знаем, например, что каналы образованы четырьмя или более субъединицами или доменами, собранными в определенном порядке вокруг центральной поры. Каждая субъединица или домен включает, в свою очередь, от двух до шести трансмембранных участков, объединенных вне- и внутриклеточными петлями. Ансамбль, состоящий из субъединиц, составляет структуру, достаточную, чтобы на адекватный сигнал образовать пору, пропускающую ионы. Каналы, являющиеся относительно избирательными, такие как потенциал-зависимые каналы, обычно представляют собой тетрамеры; более крупные и менее избирательные лиганд-активируемые каналы являются пентамерами. Как продолжение этого принципа наиболее крупные каналы — щелевые контакты — имеют гексамерную структуру (глава 7).

Для некоторых каналов до сих пор остается неясной функциональное предназначение ряда трансмембранных участков субъединиц. Однако имеется несколько примеров, в которых функция отдельных участков достаточно твердо установлена. Например, четко доказано, что M2 участок субъединиц суперсемейства АХР формирует стенку ионной поры и воротный механизм. Рентгеновская дифракция выявила структурную основу ионной избирательности калиевых каналов. Этот результат может быть экстраполирован на другие каналы, имеющие подобные первичные последовательности, такие как потенциал-зависимые каналы, каналы внутреннего выпрямления, каналы, активируемые циклическими нуклеотидами, и каналы, активируемые АТФ. Большинство исследователей считает, что трансмембранные участки каналов представляют собой α-спирали. Структурные исследования подтвердили это предположение для $K_{CS}A$ канала, но не для никотинового АХР, у которого M2 сегмент представлен более крупной β-спиралью.

Внемембранные петли, соединяющие трансмембранные участки, обеспечивают ряд специфических функций, наиболее важной из которых является формирование центров связывания внутриклеточных и внеклеточных лигандов, регулирующих функции канала. Кроме того, накопление ионов во внемембранных устьях канала помогает регулировать ионную избирательность и повышает проводимость канала. Многие детали молекулярного устройства каналов остаются невыясненными, но, вооруженные современными техническими возможностями, мы можем надеяться на быстрый прогресс наших знаний о молекулярной основе функционирования нервной системы.

Выводы

- Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы электрического органа *Torpedo* состоят из пяти субъединиц (две α и три другие, обозначаемые β, γ и δ), группирующихся вокруг центральной поры. α-субъединицы содержат связывающие сайты для АХ.
- В каждой субъединице АХ рецептора имеется четыре трансмембранных участка (M1–M4), объединенных внутри- и внеклеточными петлями. Показано, что M2 участок белка формирует пору ионного канала.

- Из нервной системы выделены одиннадцать отдельных субъединиц никотинового АХ рецептора, восемь из которых имеют сайты, связывающие АХ (и обозначаемые как α_2–α_9), и три других обозначаются β_2–β_4. Большинство комбинаций α–β-субъединиц могут формировать функциональные каналы, способные отвечать на АХ.
- Субъединицы рецепторов γ-аминомасляной кислоты (ГАМК), глицина и серотонина (5-НТ) аналогичны по структуре субъединицам АХ рецептора. Вместе четыре этих семейства рецепторов образуют суперсемейство, имеющее общее генетическое происхождения.
- Потенциал-активируемый натриевый канал электрического органа угря является одиночной молекулой, состоящей из 1 800 аминокислот. Этот канал имеет четыре крупных повторяющихся домена (I–IV). Домены являются архитектурными эквивалентами субъединиц других каналов; внутри каждого имеется шесть трансмембранных участков (S1–S6), соединенных внутри- и внеклеточными петлями. Натриевый ионный канал угря является прототипом разнообразных изоформ этого канала, представленных в мышцах и мозге.
- Семейство потенциал-активируемых кальциевых каналов аналогично по структуре натриевому каналу. Потенциал-активируемые калиевые каналы структурно подобны натриевым и кальциевым каналам, но с важным отличием: у них четыре повторяющихся домена экспрессированы как отдельные субъединицы, а не как повторяющиеся домены одной молекулы. Существует по меньшей мере 20 генов, контролирующих экспрессию субъединиц калиевого канала. Калиевые каналы группируются в четыре отдельных подсемейства. Потенциал-активируемые натриевый, кальциевый и калиевый каналы составляют вместе единое суперсемейство.
- Субъединицы других лиганд- и потенциал-активируемых ионных каналов значительно различаются как размерами, так и аминокислотным составом. Некоторые имеют сходство с субъединицами потенциал-активируемых каналов, но большинство заметно отличаются от представителей как потенциал-, так и АХ-активируемых каналов. Некоторые имеют только два или три трансмембранных домена, а другие могут иметь больше 10 таких доменов.

Рекомендуемая литература

- Akabas, M. H., Kauffman, C., Archdeacon, P., and Karlin, A. 1994. Identification of acetylcholine receptor channel-linning residues in the entire M2 segment of the α subunit. *Neuron* 13: 919–927.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfeutzner, A. K.,Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and McKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280: 69–77.
- Hille, B. 1992. *Ionic Channels in Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 236–258, 423–444.
- Levinson, S. R. 1998. Structure and mechanism of voltage-gated ion channels. In N. Sperelakis (ed.), *Cell Physiology Source Book*, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 406–428.
- McGehee, D. S., and Role, L. W. 1995. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 521–546.
- Miller, C. 1992. Hunting for the pore of voltage-gated channels. *Curr. Biol.* 2: 573–575.
- Unwin, N. 1993. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229: 1101–1124.
- Unwin, N. 1995. Acetylcholine receptor imaged in the open state. *Nature* 373: 37–43.

Цитированная литература

1. Tank, D. W., et al. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5129–5133.
2. Wise, D. S., Schoenborn, B. P., and Karlin, A. 1981. *J. Biol. Chem.* 256: 4124–4126.
3. Unwin, N., Toyoshima, C., and Kubalek, E. 1988. *J. Cell Biol.* 107: 1123–1138.
4. Toyoshima, C., and Unwin, N. 1988. *Nature* 336: 247–250.

5. Maeno, T., Edwards, C., and Anraku, M. 1977. *J. Neurobiol.* 8: 173–184.
6. Dwyer, T. M., Adams, D. J., and Hille, B. 1980. *J. Gen. Physiol.* 75: 469–492.
7. Raftery, M. A., et al. 1980. *Science* 208: 1454–1457.
8. Noda, M., et al. 1982. *Nature* 299: 793–797.
9. Noda, M., et al. 1983. *Nature* 301: 251–255.
10. Noda, M., et al. 1983. *Nature* 302: 528–532.
11. McCrea, P. D., Popot, J-L., and Engleman, D. M. 1987. *EMBO J.* 6: 3619–3626.
12. DiPaola, M., Czajkowski, C., and Karlin, A. 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 15457–15463.
13. Miledi, R., Parker, I., and Sumikawa, K. 1983. *Proc. R. Soc. Lond. B* 218: 481–484.
14. Takai, T., et al. 1985. *Nature* 315: 761–764.
15. Mishina, M., et al. 1986. *Nature* 321: 406–411.
16. Leonard, R. J., et al. 1988. *Science* 242: 1578–1581.
17. Akabas, M. H., et al. 1994. *Neuron* 13: 919–927.
18. Unwin, N. 1993. *J. Mol. Biol.* 229: 1101–1124.
19. Unwin, N. 1995. *Nature* 373: 37–43.
20. Wilson, G. G., and Karlin, A. 1998. *Neuron* 20: 1269–1281.
21. Ortells, M. O., and Lunt, G. G. 1995. *Trends Neurosci.* 18: 121–127.
22. Colquhoun, L. M., and Patrick, J. W. 1997. *Adv. Pharmacol.* 39: 191–220.
23. McGehee, D. S., and Role, L. W. 1995. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 521–546.
24. Cooper, E., Couturier, S., and Ballivet, M. 1991. *Nature* 350: 235–238.
25. Sieghart, W. 1995. *Pharmacol. Rev.* 47: 181–234.
26. McKernan, R. M., and Whiting, P. J. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 139–143.
27. Bormann, J., and Feigenspan, A. 1995. *Trends Neurosci.* 18: 515–519.
28. Kuhse, J., Betz, H., and Kirsch, J. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 318–323.
29. Yakel, J. L., and Jackson, M. B. 1988. *Neuron* 1: 615–621.
30. Maricq, A. V., et al. 1991. *Science* 254: 432–437.
31. Ortells, M. O., and Lunt, G. G. 1995. *Trends Neurosci.* 18: 121–127.
32. Unwin, N. 1989. *Neuron* 3: 665–676.
33. Miller, J., Agnew, W. S., and Levinson, S. R. 1983. *Biochemistry* 22: 462–470.
34. Hartshorn, W. A., and Catterall, W. A. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 1667–1675.
35. Barchi, R. L. 1983. *J. Neurochem.* 40: 1377–1385.
36. Noda, M., et al. 1984. *Nature* 312: 121–127.
37. Cormick, K. A., et al. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 3954–3962.
38. Trimmer J. S., et al. 1989. *Neuron* 3: 33–49.
39. Kallen, R. G., et al. 1990. *Neuron* 4: 233–342.
40. Rogart, R. B., et al. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8170–8174.
41. Hofmann, F., Biel, M., and Flockerzi, V. 1994. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 399–418.
42. Randall, A., and Tsien, R. W. 1995. *J. Neurosci.* 15: 2995–3012.
43. Tanabe, T., et al. 1987. *Nature* 328: 313–318.
44. Walker, D., and De Waard, M. 1998. *Trends Neurosci.* 21: 148–154.
45. Papazian, D. M., et al. 1987. *Science* 237: 749–753.
46. Timpe, L. C., et al. 1988. *Nature* 331: 143–145.
47. Salkoff, L., et al. 1992. *Trends Neurosci.* 15: 161–166.
48. Jan, L. Y., and Jan, Y. N. 1997. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 91–123.
49. MacKinnon, R. 1991. *Nature* 350: 232–238.
50. Yool, A. J., and Schwarz, T. L. 1991. *Nature* 349: 700–704.
51. Yellen, G., et al. 1991. *Science* 251: 939–942.
52. Miller, C. 1992. *Curr. Biol.* 2: 573–575.
53. Heinemann, S. H., et al. 1992. *Nature* 356: 441–443.
54. Doyle, D. A., et al. 1998. *Science* 280: 69–77.
55. MacKinnon, R., et al. 1998. *Science* 280: 106–109.
56. Mullins, L. J. 1975. *Biophys. J.* 15: 921–931.
57. Liu, Y., et al. 1997. *Neuron* 19: 175–184.
58. Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., and Schwarz, G. 1990. *Nature* 348: 510–514.
59. Jentsch, T. J., et al. 1995. *J. Physiol.* 482P: 19S–25S.
60. Schmidt-Rose, Y., and Jentsch, T. J. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7633–7638.
61. Middleton, R. E., Pheasant, D. J., and Miller, C. 1996. *Nature* 383: 337–340.
62. Doupnik, C. A., Davidson, N., and Lester, H. A. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 268–277.
63. Nicholls, C. G., and Lopatin, A. N. 1997. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 171–191.
64. Burnstock, G. 1996. *Drug Dev. Res.* 39: 204–242.
65. Burnstock, G. 1996. *P2-Purinoceptors: Localization, Function and Transduction Mechanisms.* Wiley, London.
66. Soto, F., Garcie-Guzman, M., and Stühmer, W. 1997. *J. Membr. Biol.* 160: 91–100.
67. Seeburg, P. H. 1993. *Trends Neurosci.* 16: 359–365.
68. Moriyoshi, K., et al. 1991. *Nature* 354: 31–37.
69. Keinän, K., et al. 1990. *Science* 249: 556–560.
70. Egebjerg, J., et al. 1991. *Nature* 351: 745–748.
71. Dani, J. A., and Mayer, M. I. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 310–317.
72. Hollmann, M., Maron, C., and Heinemann, S. 1994. *Neuron* 13: 1331–1343.
73. Finn, J. T., Grunwald, M. E., and Yau, K-W. 1996. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 395–426.
74. Zagotta, W. N., and Siegelbaum, S. A. 1996. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 235–263.
75. Köhler, M., et al. 1993. *Neuron* 10: 491–500.
76. Kyte, J., and Doolittle, R. F. 1982. *J. Mol. Biol.* 157: 105–132.

Глава 4

Транспорт через мембрану клетки

Вход и выход ионов через каналы в мембране нейрона имеет пассивный характер и происходит благодаря наличию электрических и химических градиентов. Для компенсации результатов передвижения ионов клетка использует активные транспортные механизмы, которые затрачивают энергию на перемещение ионов в направлении, противоположном их электрохимическим потенциалам. Таким образом, концентрации ионов в цитоплазме поддерживаются на постоянном уровне, что позволяет сохранить неизменным потенциал покоя, а также генерировать электрические сигналы.

Первичный активный транспорт осуществляется за счет энергии гидролиза АТФ. Наиболее распространенный пример такого транспорта — натрий-калиевый обменник, или насос. Специальная молекула, называемая натрий-калиевой АТФазой, осуществляет за счет энергии расщепления одной молекулы АТФ перенос трех ионов натрия наружу и двух ионов калия внутрь клетки. Поскольку в результате каждого транспортного цикла происходит изменение суммарного трансмембранного заряда на единицу, натрий-калиевый насос является электрогенным, то есть производит электричество. Другой пример активного ионного транспорта — АТФазы, выводящие кальций из цитоплазмы: кальциевые АТФазы плазматической мембраны выкачивают кальций за пределы клетки, а АТФазы эндоплазматического и саркоплазматического ретикулумов закачивают кальций из цитоплазмы во внутриклеточные структуры.

Вторичный активный транспорт основан на энергии передвижения ионов натрия в направлении их электрохимического градиента. При этом другие ионы переносятся за счет движения ионов натрия либо в том же (ко-транспорт), либо в обратном направлении (ионообмен). Примером такого механизма является натрий-кальциевый обменник, выводящий один ион кальция за счет входа в клетку трех ионов натрия. Как и все системы активного транспорта, этот обменник обратим и может работать как в прямом, так и в обратном направлении, в зависимости от соотношения электрических и химических градиентов для обоих ионов. Вторая система натрий-кальциевого обмена встречается в клетках сетчатки и осуществляет перенос одного иона кальция и одного иона калия наружу, в обмен на четыре входящих иона натрия. Энергия входа натрия в клетку используется также для переноса ионов хлора и бикарбоната через клеточную мембрану. Все вышеперечисленные механизмы основаны на передвижении натрия в направлении его электрохимического градиента и, следовательно, зависят от эффективности работы натрий-калиевого насоса, обеспечивающего поддержание этого градиента.

Транспорт медиаторов необходим для функционирования нейронов. Накопление молекул медиатора в синаптических пузырьках (везикулах) в цитоплазме пресинаптического окончания невозможно без такого транспорта, основанного на перемещении ионов (ионно-сопряженный транспорт). Подобный же механизм используется для обратной закачки медиатора после его выброса в синаптическую щель.

На сегодняшний день выделен и клонирован целый ряд транспортных АТФаз и высказаны предположения об их конфигурации в клеточной мембране. Все АТФазы состоят из 10–12 трансмембранных сегментов, которые, по всей вероятности, образуют канало-подобные структуры. Передвижение веществ по этим каналам происходит в результате выдвижения участков, соответствующих местам связывания ионов, поочередно то во внеклеточную, то во внутриклеточную среды.

В главе 2 обсуждался механизм генерации электрических сигналов при перемещении ионов через каналы в плазматической мембране. Так, например, движение положительных ионов натрия внутрь клетки приводит к снижению суммарного негативного заряда на внутренней стороне мембраны, то есть приводит к ее деполяризации. Напротив, вход в клетку отрицательно заряженных ионов хлора влечет за собой гиперполяризацию. Движение ионов через каналы носит пассивный характер и обусловлено наличием электрических и концентрационных градиентов на мембране. При отсутствии компенсирующих процессов такое передвижение ионов очень скоро привело бы к полному исчезновению электрохимических градиентов.

Существует, однако, целый ряд механизмов активного транспорта, которые перемещают ионы в направлении, противоположном электрохимическому градиенту. Эти механизмы компенсируют утечку ионов, происходящую как в покое, так и в результате электрической активности. Активный транспорт подразделяется на первичный и вторичный. **Первичный** транспорт происходит за счет прямого использования метаболической энергии, а именно, энергии расщепления АТФ. **Вторичный** активный транспорт использует энергию потока ионов (чаще всего ионов натрия) в направлении их электрохимического градиента для перемещения других ионов через мембрану либо в том же (ко-транспорт), либо в противоположном направлении (ионообмен).

§ 1. Натрий-калиевый обменный насос

Большинство возбудимых клеток имеют потенциал покоя от −90 до −60 мВ. Равновесный потенциал для ионов натрия (E_{Na}) — обычно порядка +50 мВ. Таким образом, существует большой электрохимический потенциал, стремящийся перенести ионы натрия внутрь клетки. Такой перенос осуществляется при помощи многочисленных механизмов. Кроме того, равновесный потенциал для калия более отрицателен, чем потенциал покоя, вследствие чего ионы калия постоянно выводятся из клетки. Для поддержания жизнеспособности клетки необходимо, чтобы ионы натрия непрерывно переносились наружу, а ионы калия внутрь клетки, т. е. против их электрохимических градиентов. Для этой цели в мембране клетки существует натрий-калиевый обменный насос, который при каждом своем цикле переносит три иона натрия наружу и два иона калия внутрь клетки.

Уже ранние эксперименты Ходжкина и Кейнеса[1, 2] на гигантском аксоне кальмара убедительно показали, что источником энергии для этого процесса является расщепление АТФ. В то же время Скау[3] продемонстрировал, что АТФаза, изолированная из нерва краба, обладает многими из биохимических характеристик, которые должен иметь натрий-калиевый насос. Действительно, как для работы насоса, так и для активации АТФазы необходимо присутствие ионов натрия и калия. Кроме того, уабаин (ouabain) одинаково блокирует активность насоса и АТФазы.

На основе этих наблюдений был сделан вывод о том, что натрий-калиевая АТФаза и есть натрий-калиевый насос. Она принадлежит к семейству АТФаз Р-типа (P-type), получившему свое название потому, что в процессе работы эти АТФазы образуют фосфорилированную форму. Перенос ионов осуществляется за счет энергии расщепления АТФ. К этому же семейству относятся кальциевые АТФазы, выводящие ионы кальция из цитоплазмы клетки, и протон-калиевые АТФазы, наиболее примечательная функция которых заключается в секреции большого количества кислоты в полость желудка.

Биохимические свойства натрий-калиевой АТФазы

Биохимические свойства натрий-калиевой АТФазы хорошо известны уже на протяжении многих лет[4]. Стехиометрическое соотношение связываемых катионов совпадает со свойствами транспортного процесса: в среднем, на каждую расщепляемую молекулу АТФ переносится три иона натрия и два иона калия. Избирательность к ионам калия весьма высока: это единственный субстрат, переносимый насосом наружу клетки, и единственный моновалентный катион, не принимаемый насосом для переноса внутрь. Например, литий, аммоний, рубидий, цезий и таллий могут заменить калий во внеклеточном растворе, но не натрий во внутриклеточном. В отсутствии калия насос переносит натрий гораздо менее эффективно (около 10 % мощности).

Специфическим блокатором натрий-калиевой транспортной системы являются вещества, используемые при лечении сердечной

недостаточности (digitalis glycosides), в особенности уабаин и строфантидин. Блокируя активный транспорт натрия и калия, эти вещества не оказывают воздействия на пассивное перемещение ионов через ионные каналы в мембране.

Экспериментальные доказательства электрогенности насоса

В результате того, что насос переносит за один цикл неодинаковое количество ионов натрия и калия, происходит суммарный перенос через мембрану одного положительного заряда. Поэтому насос называется **электрогенным**. Это свойство насоса было протестировано экспериментально на аксоне кальмара[1, 2, 5], а также Томасом на нейронах улитки[6, 7]. Нейроны улитки достаточно велики для того, чтобы можно было ввести несколько микроэлектродов в цитоплазму, не повреждая клетки. Для исследования взаимосвязи между внутриклеточной концентрацией натрия, током через насос и мембранным потенциалом Томас использовал две микропипетки для введения ионов в клетку, одна из которых была заполнена ацетатом натрия, а другая ацетатом лития (рис. 4.1A). Третья пипетка использовалась в качестве электрода для регистрации мембранного потенциала. Четвертая пипетка служила токовым электродом, обеспечивающим режим фиксации потенциала (voltage-clamp; глава 6). Еще один электрод, сделанный из натрий-чувствительного стекла, позволял измерять внутриклеточную концентрацию натрия. Для инъекции натрия, на электрод, заполненный ионами натрия, подавалось положительное напряжение по отношению к электроду, содержащему ионы лития. Таким образом, весь ток в инъекционной системе протекал между двумя пипетками внутри клетки, а не через клеточную мембрану.

Результат опыта показан на рис. 4.1B. После кратковременной инъекции работа насоса активизировалась и мембрана клетки гиперполяризовалась приблизительно на 20 мВ. По мере того, как избыточное количество натрия выводилось из клетки, мембранный потенциал постепенно восстанавливался, что занимало несколько минут. Инъекция лития, произведенная посредством приложения положительного потенциала к литиевой пипетке, не привела к гиперполяризации клетки.

Можно выделить несколько фактов, подтверждающих участие насоса в изменении мембранного потенциала. Так, в присутствии блокатора транспорта (уабаина) гиперполяризация мембраны была значительно менее выраженной или полностью устранялась (рис. 4.1C). Кроме того, устранение калия из внеклеточного раствора приводило к исчезновению влияния инъекции натрия на мембранный потенциал; восстановление уровня внеклеточного калия после инъекции натрия вызывало немедленную гиперполяризацию (рис. 4.1D).

Количественные оценки скорости работы насоса и соотношения обмениваемых ионов были получены в опытах с фиксацией потенциала. Этот метод (описанный в главе 6) позволяет измерять ток, протекающий через мембрану, в то время как мембранный потенциал поддерживается на неизменном уровне. Концентрация натрия также измерялась в ходе этого опыта. Инъекция натрия вызвала кратковременное повышение его внутриклеточной концентрации, которое сопровождалось выходящим током. Длительность и амплитуда этого выходящего тока зависели от изменения концентрации натрия внутри клетки (рис. 4.1E). Величина суммарного заряда, перенесенного наружу клетки, была подсчитана на основании измерения интеграла мембранного тока (то есть площади под кривой тока). Суммарный заряд составил приблизительно одну треть заряда ионов натрия, инъецированных в клетку. Эти данные подтверждают представление о том, что на каждые три иона натрия, выводимого насосом из клетки, приходится два иона калия, переносимые внутрь.

Механизм переноса ионов

Рис. 4.2 иллюстрирует последовательность событий, лежащих в основе переноса ионов натрий-калиевым насосом. Внутри каналоподобной структуры насоса расположены места связывания калия и натрия, которые поочередно вступают в контакт с внутриклеточной и внеклеточной средами. Циклическое изменение конформации насоса происходит за счет фосфорилирования и дефосфорилирования его белковой молекулы. Этот процесс сопровождается изменением сродства мест связывания к соответствующим ионам. Места связывания, направленные внутрь клетки, имеют низкое сродство к калию и высокое к натрию (рис. 4.2A). Связывание трех ионов натрия ведет к изменению конформации белка, последующему связыванию АТФ и фосфорилированию фермента (рис. 4.2B).

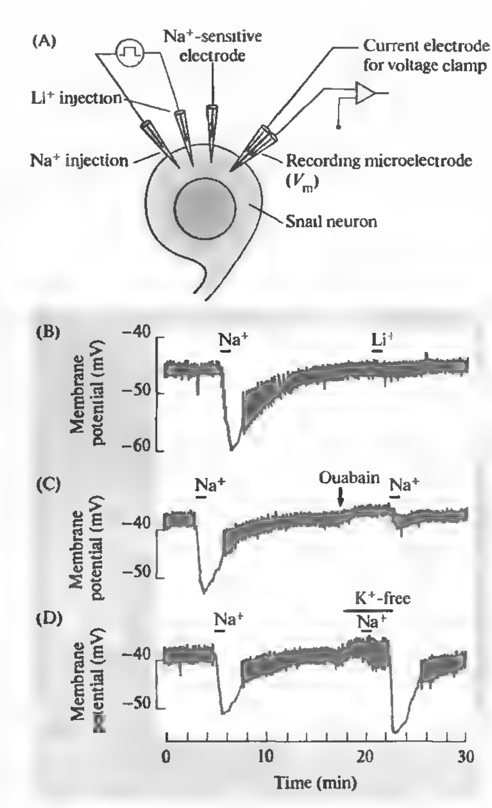


Рис. 4.1. Влияние инъекции натрия в нейрон улитки на внутриклеточную концентрацию натрия, мембранный потенциал и ток через мембрану. (А) Два микроэлектрода используются для инъекции натрия или лития. Натрий-чувствительный электрод измеряет концентрацию натрия внутри клетки. Еще один электрод используется либо для измерения мембранного потенциала, либо, в паре с токовым электродом, для фиксации потенциала на определенном уровне с целью измерения тока через мембрану (показан на рис. 4.1E). (B) Гиперполяризация мембраны вследствие инъекции натрия. (Небольшие кратковременные выбросы на кривой представляют собой спонтанные потенциалы действия, размер которых преуменьшен за счет инертности самописца.) Инъекция лития не влечет за собой гиперполяризации. (C) После подачи блокатора натриевых насосов уабаина (20 г/мл) инъекция натрия вызывает значительно менее выраженную гиперполяризацию. (D) Удаление калия из внеклеточной среды блокирует насос, поэтому инъекция натрия не вызывает гиперполяризации до тех пор, пока уровень калия не восстанавливается. (E) Измерение мембранного тока при потенциале, фиксированном на −47 мВ. В результате инъекции натрия его внутриклеточная концентрация повышается, и через мембрану протекает выходящий ток. Выбросы на кривой натриевой концентрации представляют собой артефакты инъекционной системы; временной ход изменений этой концентрации показан пунктиром.

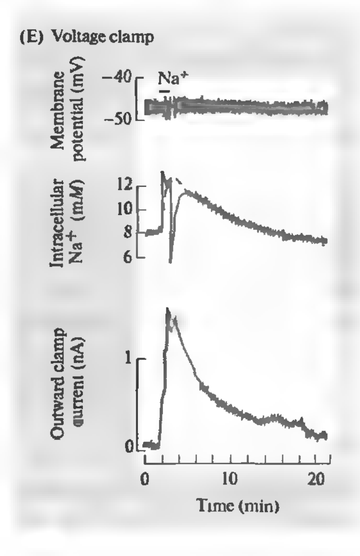


Fig. 4.1. Effects of Sodium Injection into a snail neuron on intracellular sodium concentration, membrane potential, and membrane current. (A) Two micropipettes are used to inject either sodium or lithium. A sodium-sensitive electrode measures the intracellular sodium concentration. Another electrode measures membrane potential or, alternatively, is used in combination with a current-passing electrode to hold the membrane potential steady while measuring membrane current (shown in E). (B) Hyperpolarization of the membrane following intracellular injection of sodium. (The small rapid deflections are spontaneously occurring action potentials, reduced in size because of the poor frequency response of the pen recorder.) Injection of lithium does not produce hyperpolarization. (C) After application of ouabain (20 g/ml), which blocks the sodium pump, hyperpolarization by sodium injection is greatly reduced. (D) Removal of potassium from the extracellular solution blocks the pump, so sodium injection produces no hyperpolarization until potassium is restored. (E) Measurements of membrane current, with the membrane potential clamped at −47 mV. Sodium injection results in an increase in intracellular sodium concentration, and an outward current across the cell membrane. Sharp deflections on the sodium concentration record are artifacts from the injection system; the time course of the concentration change is indicated by the dashed line. (After Thomas, 1969.)

Фосфорилирование приводит к дальнейшему изменению конформации, в результате которого места связывания ионов оказываются в контакте с внеклеточной средой (рис. 4.2С). В этом положении места связывания обладают низким сродством к натрию и вы-

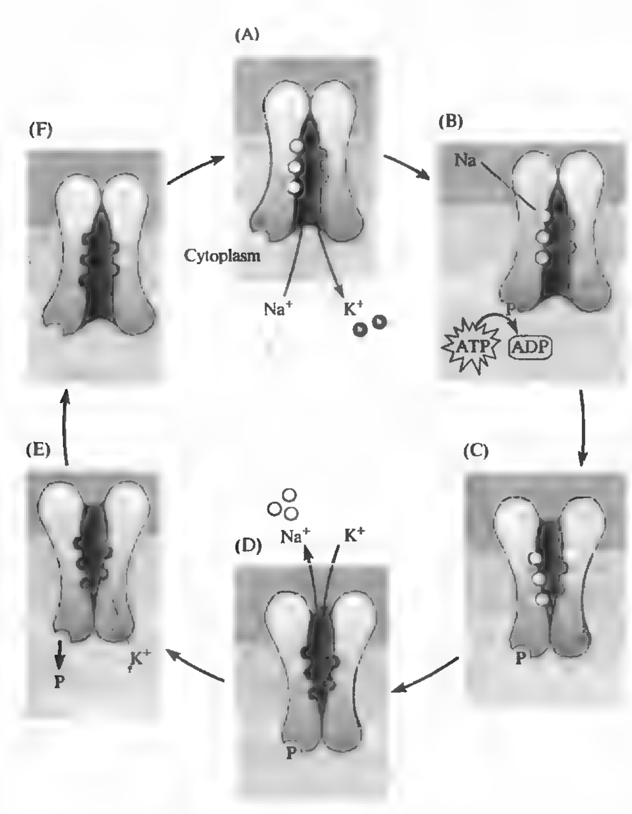


Рис. 4.2. Перенос ионов Na–K АТФазой. (A) Посадочные места, направленные внутрь клетки, обладают высоким сродством к натрию и низким — к калию. Ионы калия, до этого момента связанные с молекулой АТФазы, высвобождаются, в то время как ионы натрия связываются с ней. (B) Вслед за связыванием натрия происходит связывание молекулы АТФ и фосфорилирование фермента. (C) В результате фосфорилирования в структуре фермента происходят изменения, приводящие к выдвижению посадочных мест во внеклеточную среду. (D) В таком положении посадочные места обладают низким сродством к натрию и высоким — к калию, поэтому они связывают два иона калия. (E) При связывании калия АТФаза дефосфорилируется. (E) Возврат в первоначальное состояние.

Fig. 4.2. Ion Translocation by Na–K ATPase. (A) Inward-facing binding sites have a high affinity for sodium and a low affinity for potassium. Previously bound potassium ions are released and three sodium ions are bound. (B) Sodium binding is followed by ATP binding and phosphorylation of the enzyme. (C) The phosphorylated enzyme undergoes a conformational change such that its binding sites face the extracellular solution. (D) Outward-facing sites have a low affinity for sodium and high affinity for potassium, and they bind two potassium ions. (E) Potassium binding leads to dephosphorylation. (F) Dephosphorylation is followed by a return to the starting conformation.

соким к калию, поэтому ионы калия замещают два иона натрия (рис. 4.2D). Связывание калия вызывает дефосфорилирование фермента (рис. 4.2E) и возвращает насос в первоначальное положение (рис. 4.2F). Ионы калия высвобождаются во внутриклеточное пространство.

§ 2. Кальциевые насосы

Изменение концентрации ионов кальция внутри клетки играет важнейшую роль во многих процессах жизнедеятельности нейронов, таких как высвобождение медиатора в синаптическую щель, активация ионных каналов в клеточной мембране, а также регуляция целого ряда цитоплазматических ферментов. В мышечных клетках кальций играет ключевую роль в запуске процесса сокращения мышечного волокна. Все эти функции связаны с кратковременным повышением концентрации кальция в цитоплазме, поэтому важной задачей для клетки является поддержание неизменного уровня кальция в покое. В противном случае различные кальций-зависимые механизмы будут активироваться не в ответ на специфическое раздражение, а постоянно.

Изменение концентрации кальция в цитоплазме может происходить по двум причинам: кальций может входить или выходить через клеточную мембрану, либо переходить из цитоплазмы во внутриклеточные органеллы и обратно (рис. 4.3)[8], в первую очередь в эндоплазматический ретикулум

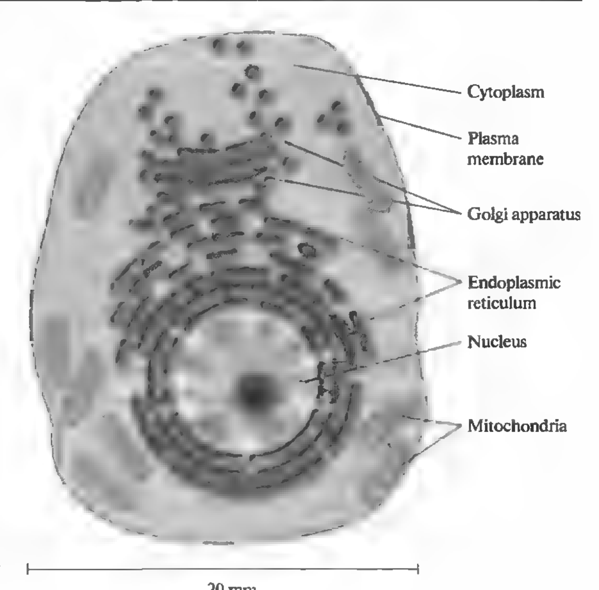


Рис. 4.3. Внутриклеточные органеллы. В цитоплазме клетки находится множество внутриклеточных огранелл. Некоторые из них — в первую очередь эндо- и саркоплазматический ретикулумы — способны запасать кальций.

Fig. 4.3. Intracellular Compartments. Within the cytoplasm of animal cells are numerous intracellular compartments. Some of these compartments—principally the endoplasmic reticulum and mitochondria—sequester calcium.

(в мышце — саркоплазматический ретикулум) и митохондрии[9]. Для измерения внутриклеточной концентрации кальция в клетку вводятся специальные вещества, такие как экворин[10] (aequorin) или фура-2[11] (fura2), которые излучают или поглощают свет при связывании ионизированного кальция. Другой способ отслеживания изменений уровня кальция — трансфекция особых белковых комплексов[12, 13], созданных при помощи генной инженерии таким образом, что их флуоресцентные свойства изменяются в зависимости от концентрации ионизированного кальция. В обоих случаях изменения в поглощении или излучении, пропорциональные изменениям уровня кальция, измеряются с помощью высокочувствительных оптических методов. Средняя концентрация кальция в покое для большинства нейронов составляет от 10 до 100 нМ. Уровень кальция в межклеточном пространстве позвоночных составляет от 2 до 5 ммоль.

Для поддержания низкой внутриклеточной концентрации кальция необходим механизм, осуществляющий непрерывный вывод кальция из клетки вопреки наличию значительного концентрационного градиента. Кроме того, системы кальциевого транспорта через внутриклеточные мембраны поддерживают высокую концентрацию кальция в органеллах. Так, уровень кальция в эндоплазматическом ретикулуме может достигать 400 мкмоль[12, 14], а в саркоплазматическом ретикулуме мышцы поднимается до 10 ммоль[15]. Молекула, ответственная за транспорт кальция через плазматическую и цитоплазматическую мембраны, называется **кальциевая АТФаза**. Еще один механизм транспорта кальция будет обсуждаться ниже в этой главе.

АТФазы эндоплазматического и саркоплазматического ретикулумов

Одно из семейств АТФаз расположено в мембране эндоплазматического ретикулума нейронов, а также в саркоплазматической мембране скелетной мышцы. Эти АТФазы переносят ионы кальция из цитоплазмы во внутриклеточные органеллы. Сокращение мышечного волокна происходит при освобождении кальция из саркоплазматического ретикулума в миоплазму. Быстрое устранение ионов кальция из миоплазмы, необходимое для релаксации мышцы, обеспечивается за счет высокой концентрации АТФаз в мембране саркоплазматического ретикулума.

Кальциевый транспортный цикл в принципе аналогичен циклу работы натрий-калиевого насоса, показанному на рис. 4.2. Он начинается с присоединения двух ионов кальция к местам связывания, расположенным в цитоплазме и обладающим высоким сродством к кальцию ($K_{m(Ca)}$ ~ 100 нМ)[16].

Затем происходит фосфорилирование фермента и изменение его конформации, в результате чего ионы кальция переносятся внутрь ретикулума. После освобождения кальция молекула АТФазы дефосфорилируется и возвращается в свое первоначальное состояние.

АТФазы плазматической мембраны

Кальциевые АТФазы встречаются также в плазматической мембране любой клетки. За исключением некоторых деталей[17], строение и функция этих АТФаз не отличается от кальциевых АТФаз эндоплазматического и саркоплазматического ретикулумов. Внутриклеточное место связывания обладает высоким сродством к кальцию[18], однако во время транспортного цикла происходит связывание всего одного иона кальция. Концентрация АТФаз в плазматической мембране нейронов и мышечных клеток довольно низка, поэтому эффективность этой транспортной системы не слишком высока. Тем не менее, с задачей устранения входящего в клетку кальция она справляется.

§ 3. Натрий-кальциевый обменник

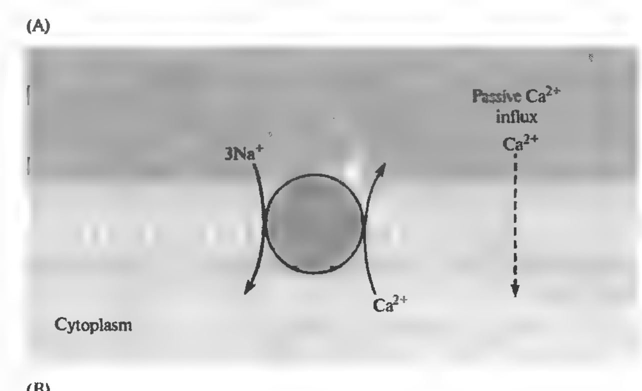
Во многих механизмах ионного транспорта используется совершенно иной принцип переноса ионов через мембрану против электрохимического градиента. Вместо энергии расщепленной молекулы АТФ эти механизмы используют энергию уже существующего перемещения ионов натрия в направлении их концентрационного градиента, то есть внутрь клетки. Один из примеров — натрий-протоновый обменник, переносящий ионы в соотношении 1 : 1 и участвующий в поддержании внутриклеточного pH. Протоны переносятся из клетки наружу вопреки электрохимическому градиенту в обмен на ионы натрия, перемещаемые внутрь клетки. Подобным же образом переносятся кальций, калий, бикарбонат и хлор. В результате работы этих вторичных транспортных механизмов, в состоянии покоя внутрь клетки попадает значительное количество натрия. Тем более важна роль натрий-калиевых обменников, выводящих натрий обратно во внеклеточную среду. В некоторых случаях механизмами вторичного активного транспорта используется энергия перемещения ионов калия в направлении их электрохимического градиента.

Транспортные системы натрий-кальциевого обмена

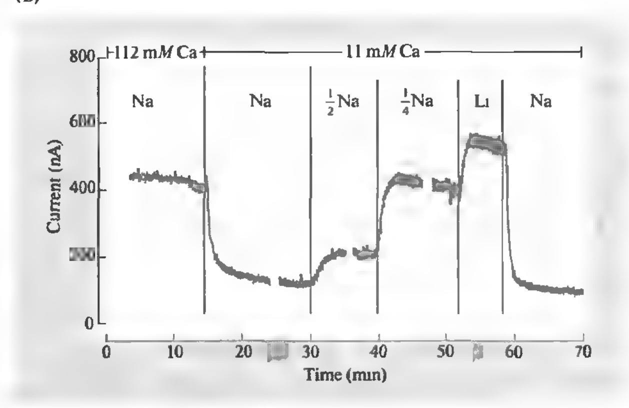
Существуют по-крайней мере два механизма натрий-кальциевого обмена. Наиболее часто встречаются обменники типа NCX (Na—Ca exchange), которые были впервые описаны в сердечной мышце[19], нерве краба[20] и аксоне кальмара[21]. При переносе транспортной молекулой одного иона кальция наружу происходит перенос трех ионов натрия внутрь клетки[22]. Несмотря на то, что сродство NCX к кальцию ниже, чем у кальциевой АТФазы, общая мощность этого транспортного механизма выше приблизительно в 50 раз, поскольку плотность таких молекул в мембране значительно выше[23, 24]. NCX играют важную роль в условиях повышенного входа кальция в клетку, вызванного электрической активностью и превышающего возможности АТФаз по устранению избыточного кальция из клетки.

На рис. 4.4 показан принцип действия механизма натрий-кальциевого обмена в аксоне кальмара. Для измерения внутриклеточной концентрации кальция использовали флуоресцентную молекулу экворин (aequorin). В состоянии покоя вход кальция в направлении электрохимического градиента уравновешивается за счет переноса ионов из клетки ионным обменником (рис. 4.4А). В начале опыта внутриклеточная концентрация кальция высока потому, что уровень кальция снаружи аксона повышен (112 ммоль). При снижении внеклеточной концентрации снижается и пассивный вход кальция в аксон. В результате снижается внутриклеточная концентрация кальция, и движущая сила для этого иона возрастает до тех пор, пока скорость пасснвного втока вновь не сравняется со скоростью выброса кальция. С другой стороны, снижение внеклеточной концентрации натрия приводит к увеличению внутриклеточной концентрации кальция, поскольку обменник медленнее выводит кальций в условиях сниженной движущей силы для натрия. Поэтому происходит повышение внутриклеточного уровня кальция, снижающее скорость входа кальция в клетку. Замена ионов кальция ионами лития, не способными участвовать в работе обменника, приводит к дальнейшему повышению внутриклеточной концентрации кальция.

(A)



(B)



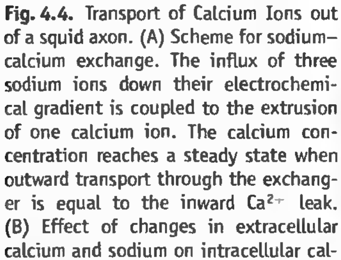


Рис. 4.4. Транспорт ионов кальция из аксона кальмара наружу. (А) Схема натрий-кальциевого обменника. Выброс одного иона кальция из клетки энергетически сопряжен с входом трех ионов натрия в направлении их электрохимического градиента. Равновесная концентрация кальция устанавливается в тот момент, когда вывод кальция обменником из клетки уравновешивает пассивный вход кальция в клетку. (В) Влияние изменений внеклеточных концентраций кальция и натрия на внутриклеточный уровень кальция. Концентрация кальция внутри клетки измеряется фотодетектором по уровню свечения экварина (aequorin), инъецированного в клетку. Снижение внеклеточной концентрации кальция с 112 до 11 ммоль влечет за собой снижение его внутриклеточного уровня. Ионы лития не способны заменить натрий в этой транспортной системе.

Fig. 4.4. Transport of Calcium Ions out of a squid axon. (A) Scheme for sodium–calcium exchange. The influx of three sodium ions down their electrochemical gradient is coupled to the extrusion of one calcium ion. The calcium concentration reaches a steady state when outward transport through the exchanger is equal to the inward Ca^{2+} leak. (B) Effect of changes in extracellular calcium and sodium on intracellular calcium concentration. Changes in intracellular calcium concentration are measured by changes in the luminescence of injected aequorin, indicated by nanoamperes of current from the photodetector. Increased readings mean increased concentrations of intracellular free calcium. Reducing the extracellular calcium concentration from 112 m*M* to 11 m*M* reduces the intracellular concentration. Reducing extracellular sodium reduces outward calcium transport, and hence increases intracellular concentration. Lithium ions do not substitute for sodium in the transport system. (From Baker, Hodgkin, and Ridgeway, 1971.)

Реверсия направления работы NCX

Изменение градиентов для одного или нескольких ионов, участвующих в работе обменника, может привести к перемене направления его работы. Интересно, что в случае NCX такая смена направления может произойти в физиологических условиях. При этом кальций будет переноситься *внутрь* клетки, а натрий — выводиться из нее. Направление работы NCX определяется разницей между энергией, выделяемой при перемещении трех ионов натрия внутрь клетки, и энергией, необходимой для переноса одного иона кальция наружу. Одним из факторов, определяющих этот энергетический баланс, является мембранный потенциал. Влияние потенциала мембраны обусловлено тем, что процесс ионообмена не является электрически нейтральным. Вследствие каждого прямого цикла работы обменника, через мембрану внутрь клетки переносится один положительный заряд. Следовательно, гиперполяризация мембраны облегчает прямой цикл обменника, в то время как деполяризация его затрудняет и может привести к изменению направления, то есть к работе обменника в режиме обратного цикла. Следует подчеркнуть, что, несмотря на отсутствие электрической нейтральности, обменники не являются электрогенными. В отличие от насосов, они работают за счет электрохимических градиентов, а не производят их.

Энергия, выделяемая за счет входа ионов натрия в клетку (или энергия, необходимая для переноса этих ионов наружу), равна про-

изведению заряда на разность между равновесным потенциалом для натрия (E_{Na}) и мембранным потенциалом (V_m). Для трех ионов натрия эта энергия будет равна $3(E_{Na} - V_m)$. Соответственно, для одного двухвалентного иона кальция энергия переноса будет равна $2(E_{Ca} - V_m)$. При определенном значении мембранного потенциала уровни энергии сравняются и перенос прекратится. Обозначив это значение через потенциал реверсии V_r, получим

$$3(E_{Na} - V_r) = 2(E_{Ca} - V_r),$$

или

$$V_r = 3E_{Na} - 2E_{Ca}.$$

При значениях потенциала более отрицательных, чем потенциал реверсии, натрий перемещается внутрь клетки, а кальций — наружу. При более положительных значениях направление движения ионов сменяется на обратное.

Предположим, что концентрации натрия и кальция в клетке принимают значения 15 ммоль и 100 нМ соответственно, а во внеклеточной среде находится 150 ммоль натрия и 2 ммоль кальция. Такие значения вполне вероятны для клеток млекопитающих. По уравнению Нернста (глава 2), равновесный потенциал для натрия будет +58 мВ, а для кальция +124 мВ. Потенциал реверсии, при котором движение ионов через обменник прекратится, будет −74 мВ. Это значение близко к потенциалу покоя многих клеток млекопитающих. Следовательно, в отдельно взятой клетке направление ионообмена может быть как прямым, так и обратным, в зависимости от текущего значения мембранного потенциала и от того, происходило ли накопление ионов натрия или кальция в этой клетке. В клетках сердечной мышцы вход кальция через NCX в ходе потенциала действия способен вызвать сокращение мышцы[25, 26], а его последующий вывод из клетки посредством того же NCX способствует релаксации[27].

Натрий-кальциевый обменник в палочках сетчатки

Для клеток с низкими значениями потенциала покоя NCX не представляется надежной системой вывода кальция из цитоплазмы. В таких клетках кальций сначала будет накапливаться до некоторого, достаточно высокого, уровня. Примером такой клетки может служить палочка сетчатки млекопитающих, мембранный потенциал покоя которой обычно находится на уровне −40 мВ (глава 19). В мембране таких клеток встречается другой тип натрий-кальциевого обменника, RetX[28)–30)]. По сравнению с NCX дополнительная энергия для переноса кальция получается за счет двух отличий в стехиометрии RetX. Во-первых, вместо трех ионов натрия через RetX проходят четыре. Во-вторых, в работе обменника участвует ион калия, также перемещающийся в направлении своего электрохимического градиента и, следовательно, выделяющий при этом дополнительную энергию. Уравнение потенциала реверсии натрий-калий-кальциевого обменника имеет следующий вид:

$$V_r = 4E_{Na} - E_K - 2E_{Ca}.$$

Исходя из подсчитанных выше значений E_{Na} и E_{Ca} и принимая значение E_K за −90 мВ, получим из уравнения Нернста $V_r = +74$ мВ. Очевидно, что вероятность реверсии ионообмена через RetX весьма мала.

Для лучшего понимания работы RetX представляется целесообразным задать следующий вопрос: какое значение должен принять равновесный потенциал E_{Ca} для того, чтобы V_r сравнялся с потенциалом покоя клетки, т. е. −40 мВ. С помощью того же уравнения получим 181 мВ, что при внеклеточной концентрации кальция 2 ммоль дает значение внутриклеточной концентрации 1 нМ. Другими словами, при мембранном потенциале −40 мВ обменник RetX обладает достаточной энергией для того, чтобы снизить уровень кальция внутри клетки до 1 нМ. Интересно отметить, что при тех же условиях NCX способен понизить внутриклеточную концентрацию кальция только до 383 нМ.

§ 4. Хлорный транспорт

Концентрация хлора внутри клетки поддерживается в строго определенных границах. В нейронах постоянство уровня хлора особенно важно, поскольку от этого фактора зависит синаптическая депрессия (ингибирование) (глава 9). Хлор-чувствительные АТФазы были описаны в клетках мозга, выращенных в культуре[31)], что указывает на возможность существования первичных механизмов транспорта хлора. Тем не менее, большая часть хлора переносится через мембрану посредством трех механизмов вторичного транспорта. Это — хлор-бикарбонатный обменник, выводящий ионы хлора из клетки через плазматическую мембрану; ко-транспорт калия

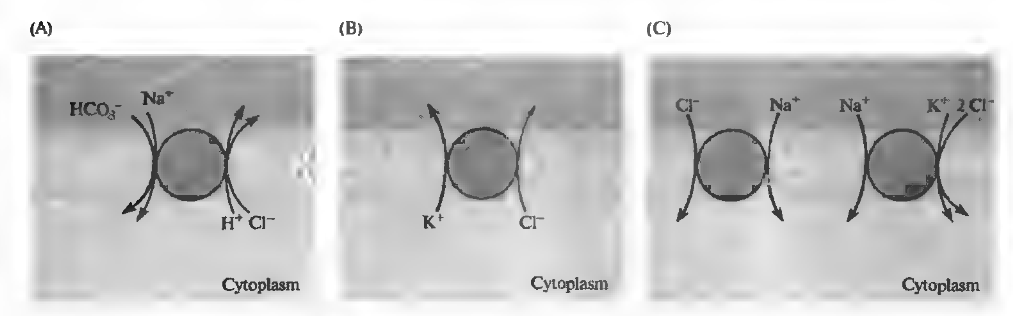


Рис. 4.5. Механизмы хлорного транспорта. (A) Хлор-бикарбонатный обменник, совместно с натрий-водородным обменником, определяет уровень pH внутри клетки. (B) Калий-хлорный ко-транспорт осуществляет вывод ионов хлора из клетки за счет энергии выходящего тока калия в направлении его электрохимического градиента. (C) В некоторых нейронах транспорт хлора внутрь клетки производится сразу двумя независимыми механизмами, использующими натриевый электрохимический градиент. Первый — натрий-хлорный ко-транспортер, второй — натрий-калий-хлорный ко-транспортер, обладающий стехиометрией 1 : 1 : 2. Заметим, что все системы транспорта хлора электрически нейтральны.

Fig. 4.5. Mechanisms of Chloride Transport. (A) Chloride–bicarbonate exchange operates in parallel with sodium–hydrogen exchange to regulate intracellular pH. (B) Potassium–chloride cotransport uses the outward electrochemical gradient for potassium to transport chloride out of the cell. (C) In some neurons, inward chloride transport is mediated by two independent mechanisms, both using the electrochemical gradient for sodium. One is sodium–chloride cotransport, the other sodium–potassium–chloride cotransport, with a stoichiometry of 1 : 1 : 2. Note that all the chloride transport systems are electrically neutral.

и хлора наружу клетки; ко-транспорт натрия, калия и хлора. Эти механизмы представлены на рис. 4.5.

Хлор-бикарбонатный обменник

Хлор-бикарбонатный обменник (рис. 4.5A) встречается в большинстве клеток. Поскольку бикарбонат играет важную роль буфера ионов водорода в цитоплазме, этот механизм, наряду с натрий-водородным обменником, участвует в поддержании внутриклеточного pH. Томас[32] проводил эксперименты по измерению pH в нейронах улитки с помощью pH-чувствительных электродов. Внутриклеточная среда закислялась посредством инъекции HCl или аппликации CO_2, после чего измерялась скорость восстановления уровня до первоначального. Восстановление замедлялось, если внеклеточный уровень бикарбоната был понижен, а также если внутриклеточная концентрация хлора была снижена. Более того, восстановления pH не происходило вовсе, если из внеклеточной среды полностью удалялся натрий. Следовательно, в процессе восстановления pH происходит перемещение ионов натрия и бикарбоната внутрь клетки в обмен на вывод ионов хлора наружу. Механизм блокируется веществами SITS и DIDS. Хлор и бикарбонат перемещаются против своих электрохимических градиентов за счет энергии, выделяемой при пассивном движении ионов натрия в направлении его градиента.

Калий-хлорный ко-транспорт

Еще одним механизмом переноса хлора является калий-хлорный ко-транспорт (рис. 4.5B)[33]. Система не чувствительна к SITS и DIDS, но блокируется фуросемидом и буметанидом (furosemide, bumetanide). Это вещества блокируют хлорный транспорт в таких клетках, как трубчатые клетки почек. Энергия для переноса хлора поступает исключительно от движения ионов калия в направлении его электрохимического градиента, поскольку система эта нечувствительна к изменениям внеклеточной концентрации натрия.

Транспорт хлора внутрь клетки

В клетках многих типов, например, в волокнах скелетной мышцы, трубчатых клетках почки, аксоне кальмара, происходит активное накопление ионов хлора. Транспорт хлора внутрь клетки зависит от внеклеточных уровней калия и натрия, не чувствителен к DIDS и блокируется фуросемидом и буметанидом (furosemide, bumetanide). В клетках почки имеется два подтипа этого механизма: первый имеет стехиометрию Na : K : Cl

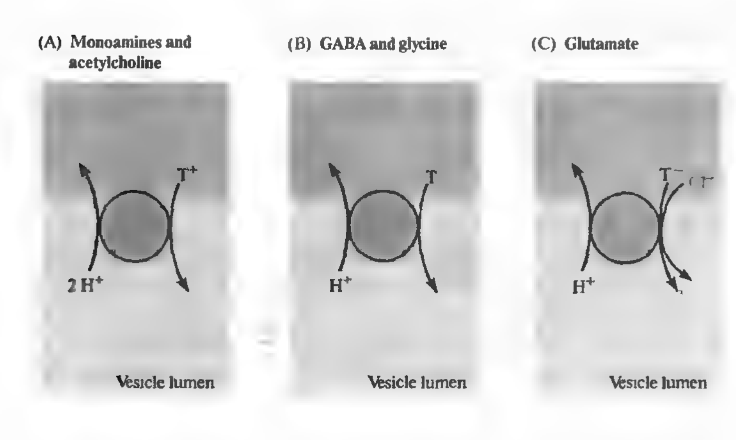


Рис. 4.6. Транспорт медиаторов (трансмиттеров) в синаптические пузырьки. Водородные АТФазы переносят протоны из цитоплазмы внутрь везикул, создавая тем самым электрохимический градиент для выхода протонов. Через молекулу вторичного посредника выходящий поток протонов предоставляет энергию для аккумуляции трансмиттера (Т) в пузырьках. Предполагается, что стехиометрия системы в случае транспорта моноаминов и ацетилхолина составляет 2 : 1 (А), глицина, ГАМК и глутамата — 1 : 1 (В и С). Вместе с глутаматом в везикулу входит хлор.

Fig. 4.6. Transport of Neurotransmitters into Synaptic Vesicles. Hydrogen ATPase transports protons into the vesicle from the cytoplasm, creating an electrochemical gradient for proton efflux. Proton efflux through the secondary transport molecule provides the energy for accumulation of the neurotransmitter (T) in the vesicle. The proposed stoichiometry is 2 : 1 for monoamine and ACh transport (A), 1 : 1 for glycine, GABA, and glutamate transport (B and C). Glutamate transport is accompanied by chloride entry into the vesicle.

в соотношении 1 : 1 : 2, а второй Na : Cl в соотношении 1 : 1 (рис. 4.5C)[34]. В экспериментах на аксоне кальмара Рассел[35, 36] показал существование натрий- и калий-зависимого транспорта хлора внутрь клетки, обладающего стехиометрией Na : K : Cl в соотношении 1 : 2 : 3. Пока неясно, объясняется ли это наличием третьего механизма хлорного транспорта или лишь одновременной работой двух вышеописанных механизмов. Транспорт хлора внутрь клетки был также описан в клетках спинного мозга головастиков[37].

§ 5. Транспорт нейромедиаторов

Помимо транспорта неорганических ионов, в нервных клетках имеются также механизмы накопления веществ, участвующих в синаптической передаче. Нейромедиаторы транспортируются в органеллы, находящиеся в цитоплазме пресинаптического нервного окончания, где и запасаются к моменту высвобождения в синаптическую щель. После высвобождения, такие медиаторы, как норэпинефрин, серотонин, ГАМК, глицин или глутамат, откачиваются из синаптической щели специальными переносчиками, расположенными в клеточной мембране самих нейронов или соседних глиальных клеток (главы 8 и 13). Все эти механизмы являются вторичными транспортными системами и черпают энергию из перемещения ионов калия, натрия или водорода в направлении их электрохимических градиентов.

Транспорт в синаптические пузырьки

Нейромедиаторы синтезируются в цитоплазме нервного окончания, после чего накапливаются в синаптических пузырьках (везикулах) при помощи механизма вторичного активного транспорта, сопряженного с выходом протонов. Этот механизм аналогичен вторичному транспорту через плазматическую мембрану, основанному на движении ионов натрия, однако вместо натриевого градиента здесь используется градиент протонов, создаваемый протонной АТФазой, переносящей протоны из цитоплазмы в синаптические пузырьки[38)–40]. Количество систем транспорта, основанных на энергии движения протонов, ограничено. Так, механизм везикулярного транспорта моноаминов обеспечивает накопление норэпинефрина, дофамина, гистамина и серотонина (5-HT). Существует также общая транспортная система для ГАМК и глицина. Ацетилхолин и глутамат обладают собственными системами закачки в пузырьки. Предполагаемая стехиометрия систем закачки показана на рис. 4.6. Все эти системы, не будучи электрически нейтральными, зависят от потенциала везикулярной мембраны и от градиента pH. Отличительная особенность механизма транспорта глутамата состо-

ит в том, что одновременно с медиатором внутрь пузырьков переносятся ионы хлора[41].

Механизм закачки медиатора в клетку

Медиаторы могут также закачиваться из внеклеточного пространства внутрь нейронов или глиальных клеток (главы 8 и 13). В целом этот процесс выполняет две задачи: 1) устранение медиатора из внеклеточного пространства, окружающего синапс, с целью прекращения его действия на постсинаптическую клетку[42, 43]; и 2) закачку медиатора обратно в пресинаптическое окончание для повторного использования в синаптической передаче. Все подобные механизмы используют электрохимический градиент натрия для перемещения медиатора в цитоплазму.

На рис. 4.7 показаны два основных типа систем закачки медиатора[44]. Механизмы первого типа сопряжены с перемещением ионов натрия внутрь и ионов калия наружу клетки. Такие системы используются для закачки нейтральных и кислых аминокислот, таких как глутамат[45]. Перемещение одной молекулы глутамата внутрь клетки сопряжено с перемещением двух или трех ионов натрия внутрь и одного иона калия наружу. Кроме того, происходит перемещение либо протона внутрь, либо гидроксильной группы наружу, что приводит к окислению внутриклеточной среды[46, 47].

Механизмы второго типа используют вход натрия для введения в клетку молекул медиатора и ионов хлора. Эти системы обеспечивают транспорт ГАМК, норэпинефрина, дофамина, глицина и серотонина в клетку. За один цикл в клетку входит один или два иона натрия, одна молекула медиатора и один ион хлора[48].

Интересным свойством таких механизмов закачки медиаторов в клетку является отсутствие электрической нейтральности. Следовательно, вариации мембранного потенциала, даже в физиологическом диапазоне, могут вызвать реверсию направления работы этих систем[49]. Действительно, в клетках клетчатки сома был показан обратный транспорт ГАМК наружу[50]. Таким образом, транспортные системы могут осуществлять не только закачку медиатора, но и его высвобождение. Реверсия механизма закачки медиатора может также иметь вредные последствия. Так, в результате травмы головного мозга или инсульта может произойти выброс глутамата из деполяризованных глиальных клеток,

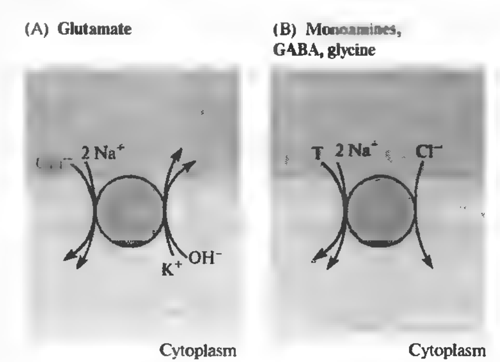


Рис. 4.7. Закачка нейромедиаторов из внеклеточного пространства. (А) Закачка глутамата сопряжена с входом двух ионов хлора и выходом одного иона калия, кроме того, она сопровождается выбросом из клетки одного иона OH^- (или HCO_3^-). (В) В системах закачки ГАМК, глицина и моноаминов (норэпинефрин, дофамин и серотонин) закачка трансмиттера (Т) сопряжена с входом двух ионов натрия и сопровождается входом одного иона хлора. Продукт гидролиза ацетилхолина, холин, закачивается в нервное окончание с той же стехиометрией, что и ГАМК, глицин и моноамины.

Fig. 4.7. Uptake of Neurotransmitters. (A) Glutamate uptake is coupled to the influx of two sodium ions and efflux of one potassium ion, and it is accompanied by the extrusion of one OH^- (or one HCO_3^-) ion. (B) In the GABA, glycine, and monoamine (norepinephrine, dopamine, and serotonin) uptake systems, recovery of the transmitter (T) is coupled to the influx of two sodium ions and accompanied by the uptake of a single chloride ion. Choline from the hydrolysis of acetylcholine is recovered into the nerve terminal with the same stoichiometry as the GABA, glycine, and monoamine systems.

приводящий к накоплению токсичных концентраций этого медиатора во внеклеточной среде и дальнейшему повреждению соседних клеток[51].

Круговорот еще одного медиатора, ацетилхолина (ACh), происходит по несколько иной схеме. ACh синтезируется из холина и ацетил-кофермента А (глава 13). После высвобождения ACh в синаптическую щель его действие на постсинаптическую клетку ограничивается особым ферментом (ацетилхолинэстеразой; глава 9), которая гидролизует ACh на ацетат и холин. Приблизительно половина молекул холина закачивается в нервное окончание с помощью высокоаффинного (K_m = 2 мкмоль) механизма и используется для синтеза ACh. Подобно механизмам закачки моноаминов, ГАМК и глицина, этот механизм также зависит от внеклеточного натрия и хлора[52].

§ 6. Молекулярная структура переносчиков

До сих пор речь шла лишь о функциональных характеристиках переносчиков, без упоминания их молекулярного строения. Как и в случае ионных каналов (глава 2), каждая функциональная группа связана с определенной белковой молекулой или, в более общем виде, с семейством молекул. Многие из них удалось изолировать и клонировать, а также сделать предположение о конфигурации этих молекул в мембране. Ниже приведены общие сведения о структуре молекул переносчиков, показанной на рис. 4.8. Большинство из них имеет от 10 до 12 трансмембранных сегментов и, как полагают, образует канало-подобные структуры. Перенос веществ через мембрану осуществляется путем попеременного выдвижения посадочных мест во внутриклеточную и внеклеточную среды.

АТФазы

Молекулярное строение натрий-калиевой АТФазы изучено достаточно детально[53, 54]. Она состоит из двух субъединиц, α и β. α-субъединица, молекулярная масса которой составляет приблизительно 100 кД, отвечает за ферментативную активность насоса и содержит все места связывания субстрата. Меньшая по размеру (35 кД) β-субъединица содержит несколько внеклеточных мест гликозилирования и также необходима для функционирования насоса, однако в чем именно состоит ее роль, неизвестно. Обе субъединицы были успешно клонированы[55, 56]. Предполагаемая структура показана на рис. 4.8А. Места связывания нуклеотидов и фосфорилирования расположены в большом цитоплазматическом участке α-субъединицы, между четвертым и пятым трансмембранными сегментами. Большая часть β-субъединицы расположена во внеклеточном пространстве, и лишь один сегмент предположительно пронизывает мембрану. Известны три изоформы α-субъединицы (α_1, α_2 и α_3), все они экспрессируются в нервной системе. Две из трех известных изоформ β-субъединицы (β_1 и β_2) найдены в нервных тканях.

Семейство кальциевых АТФаз эндо- и саркоплазматического ретикулумов (SERCA) проистекает, как минимум, из трех генов с альтернативным сплайсингом[15, 57]. Семейство кальциевых насосов плазматической мембраны (PMCA) является продуктом экспрессии четырех различных генов, каждый из которых имеет, как минимум, два варианта сплайсинга. Все эти белковые молекулы представляют собой одиночную полипептидную цепочку с молекулярной массой порядка 100 кД, структура которой напоминает α-субъединицу натрий-калиевой АТФазы с увеличенным цитоплазматическим сегментом со стороны карбоксильного окончания. В отличие от натрий-калиевой АТФазы, эти АТФазы не нуждаются в β-субъединице для осуществления своей ферментативной активности.

Натрий-кальциевые обменники

Натрий-кальциевый обменник сердечной мышцы (NCX1) представляет собой белок с молекулярной массой около 120 кД, состоящий из 970 аминокислот[59]. Второй тип, NCX2, был первоначально клонирован из мозга крысы. Оба клона обладают рядом изоформ сплайсинга[60]. С помощью гидропатического анализа и исследований с использованием антител было показано, что обменники состоят из 11 трансмембранных сегментов и большой внутриклеточной петли, расположенной между 5-м и 6-м сегментами (см. рис. 4.8В)[61]. Размер и масса RetX несколько больше: 1 199 аминокислот, 130 кД[62]. Несмотря на то, что между RetX и NCX нет большого сходства аминокислотных последовательностей, их мембранная топология должна быть сходной, как показывает гидропатический анализ.

Переносчики других ионов

В мозге крысы были найдены калий-хлорные ко-переносчики (KCC1 и KCC2)[63, 64]. Каждый из них состоит из 1100 аминокислот и имеет молекулярную массу 120 кД. На основании первичной структуры этих молекул можно заключить, что в них входят 12 трансмембранных сегментов, и что оба окончания (аминотерминаль и карбокситерминаль) расположены в цитоплазме (см. рис. 4.8С). Сходной структурой обладают молекулы обменников анионов (AE)[65], а также семейство натрий-калий-хлорных ко-переносчиков (NKCC)[34].

Молекулы переносчиков нейромедиаторов

Сходство первичных аминокислотных последовательностей транспортных белков, про-

(A) Sodium–potassium ATPase

(B) Sodium–calcium exchanger

(C) Potassium–chloride cotransporter

(D) Monoamine transporter

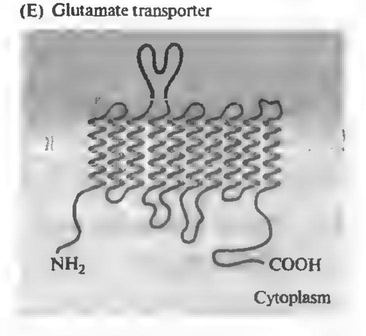


Рис. 4.8. Предполагаемая молекулярная структура транспортных молекул. Многие транспортные молекулы были успешно клонированы, а их расположение в мембране известно из результатов гидропатического анализа. (A) Натрий-калиевая АТФаза состоит из α-субъединицы, имеющей от 8 до 12 трансмембранных участков, и меньшей по размеру β-субъединицы, пронизывающей мембрану лишь один раз. Кальциевые АТФазы имеют сходное строение. (B) Натрий-кальциевые обменники насчитывают 11 трансмембранных участков. (C) Калий-хлорные котранспортеры, молекулы анионных обменников, а также натрий-калий-хлорные транспортеры имеют 12 трансмембранных участков и похожую конфигурацию в мембране. (D) Суперсемейство транспортных молекул, обеспечивающих закачку моноаминов, ГАМК и глицина, характеризуется наличием 12 трансмембранных участков. (E) Глутаматные транспортеры меньше по размеру (10 трансмембранных участков).

Fig. 4.8. Proposed Molecular Configurations of Transport Molecules. Various transport molecules have been cloned and their structure in the membrane deduced from hydropathy analyses. (A) Sodium–potassium ATPase consists of an α subunit, with 8 to 10 transmembrane segments, and a smaller β subunit that spans the membrane only once. Calcium ATPases have a similar structure. (B) Sodium–calcium exchangers have 11 transmembrane segments. (C) Potassium–chloride cotransporters, anion exchange molecules, and sodium–potassium–chloride transporters all share the same membrane configuration, characterized by 12 transmembrane segments. (D) The superfamily of transporters for the uptake of monoamines, GABA, and glycine has a motif of 12 transmembrane segments. (E) Glutamate transport molecules are smaller, with 10 transmembrane segments.

изводящих закачку в нервное окончание норэпинефрина (NET), серотонина (SERT), дофамина (DAT), ГАМК (GAT) и глицина (GLYT), позволяет заключить, что все они происходят от одного суперсемейства генов[66]. Переносчики моноаминов представляют особый интерес, поскольку именно они являются мишенью для многих наркотических веществ, включая кокаин и амфетамин, а также некоторых антидепрессантов (глава 13). Каждый член суперсемейства представлен несколькими изотипами. Белки имеют молекулярную массу от 80 до 100 кД и, как следует из гидропати-

ческого анализа, состоят из 12 трансмембранных сегментов (рис. 4.8D). По первичной последовательности молекулу переносчика холина также можно отнести к этому суперсемейству[67].

В настоящее время изолировано пять белков, осуществляющих закачку глутамата[68]. Они структурно отличаются от суперсемейства переносчиков моноаминов, ГАМК и глицина. Размер этих белков сравнительно невелик, от 500 до 600 аминокислот, при массе около 65 кД. Гидропатические данные свидетельствуют о наличии 10 трансмембранных сегментов (см. рис. 4.8E).

Семейства белков, осуществляющих закачку моноаминов, глицина, ГАМК, глутамата и ацетилхолина в синаптические пузырьки, функционально отличаются тем, что зависят не от натриевых, а от протонных градиентов. Везикулярные переносчики моноаминов (VMAT1 и VMAT2) были клонированы раньше других, за ними последовал везикулярный переносчик ацетилхолина (VAChT)[38]. Каждая из этих молекул включает в себя от 520 до 530 аминокислот и, судя по гидропатическим данным, состоит из 12 трансмембранных сегментов. Структура VMAT1 и VMAT2 совпадает на 65 %, а VAChT идентичен им на 40 %. Молекулы переносчиков ГАМК и глицина также были успешно клонированы[69, 70]. Они структурно отличаются от переносчиков моноаминов и ACh и состоят всего из 10 трансмембранных сегментов.

§ 7. Роль механизмов транспорта

Как первичные, так и вторичные механизмы активного транспорта вносят постоянный вклад в поддержание клеточного гомеостаза, а также поставляют необходимые элементы для синаптической передачи. Тем не менее, этими простыми на первый взгляд процессами их роль в жизнедеятельности нервной системы не ограничивается. Переносчики вносят существенный вклад в работу сигнальных систем клетки. Так, например, в небольших ответвлениях нервных окончаний во время распространения потенциала действия, активация натрий-калиевых АТФаз вследствие накопления внутриклеточного натрия может вызвать блок проводимости (глава 15). Другой пример связан с активацией рецепторов $ГАМК_А$, которые образуют хлорные каналы в мебране клетки (глава 3). В тех клетках, из которых переносчики выводят хлор наружу, внутриклеточные концентрации этого иона низки, и при открывании хлорных каналов $ГАМК_А$-рецепторов хлор входит в клетку, вызывая гиперполяризацню мембранного потенциала. Напротив, в тех клетках, где преобладают переносчики ионов хлора из внеклеточного пространства в цитоплазму, внутриклеточный уровень хлора сравнительно высок, и открывание $ГАМК_А$-каналов приводит к деполяризации за счет выхода хлора из клетки[37]. Таким образом, характер действия медиатора непосредственно определяется наличием тех или иных переносчиков в клетке.

Еще более важную роль играют переносчики нейромедиаторов. Быстрое удаление молекул медиатора из синаптической щели может предотвратить избыточную активацию, а также инактивацию рецепторов. Своевременная закачка медиатора в синаптические пузырьки поддерживает нервное окончание в состоянии постоянной готовности. Следовательно, переносчики выполняют важнейшую функцию регуляции динамических свойств синапсов и нервной системы в целом.

Вообще говоря, следует рассматривать ионные каналы как системы, проводящие электрические сигналы, а переносчики — как системы обеспечения базовых условий, при которых такое проведение становится возможным. Следует отметить, что между этими двумя системами зачастую происходят и более сложные взаимодействия, влияющие на работу нервной системы.

Выводы

- Перенос различных веществ через мембрану в клетку или из клетки производится целым рядом мембранных белков. Один из примеров — натрий-калиевый обменник, переносящий три иона натрия наружу и два иона калия внутрь клетки за счет энергии гидролиза одной молекулы АТФ. Обменник поддерживает внутриклеточную концентрацию натрия и калия на постоянном уровне, несмотря на утечку обоих ионов.
- Низкий уровень внутриклеточного кальция поддерживается двумя типами кальциевых АТФаз. АТФаза первого типа, расположенная в плазматической мембране, осуществляет вывод кальция из клетки. Второй тип находится в мембранах

эндо- или саркоплазматического ретикулума и обеспечивает откачку кальция из цитоплазмы во внутриклеточные органеллы.

- Еще один механизм кальциевого транспорта — натрий-кальциевый обменник. Энергия, получаемая от перемещения натрия внутрь клетки, т. е. в направлении его электрохимического градиента, затрачивается на вывод ионов кальция наружу. Это пример вторичного переносчика, работа которого зависит от поддержания натриевого градиента натрий-калиевой АТФазой. В большинстве нейронов перенос одного иона кальция происходит за счет входа в клетку трех ионов натрия. При некоторых физиологических условиях натрий-кальциевый обменник может работать в противоположном направлении. В палочках сетчатки транспортная молекула переносит один ион кальция и один ион калия в обмен на четыре иона натрия, входящих в клетку.
- Существует два основных типа молекул, осуществляющих вывод хлора из клетки. Первый — хлор-бикарбонатный обменник, играющий также важную роль в регуляции внутриклеточного pH и зависящий от электрохимического градиента натрия. Второй — калий-хлорный ко-переносчик, работа которого основана на перемещении калия из клетки наружу, т. е. в направлении его электрохимического градиента. В некоторых типах клеток хлор не выводится наружу, а наоборот, аккумулируется в клетке. Этот процесс зависит от натриевого градиента и сопровождается входом в клетку ионов калия.
- В пресинаптических нервных окончаниях перемещение молекул медиатора в синаптические пузырьки происходит в обмен на выход из них протонов. Протонный градиент на везикулярной мембране поддерживается водородными АТФазами.
- После выброса в синаптическую щель молекулы медиатора закачиваются обратно при помощи систем вторичного транспорта, которые зависят от электрохимического градиента натрия. Существует два типа систем закачки медиатора: система, в которой перенос глутамата связан с входом натрия и выходом калия, и системы закачки других медиаторов, связанной с входом в клетку ионов натрия и хлора.
- Для большинства переносчиков последовательность образующих их аминокислот известна, а гидропатический анализ позволяет сделать предположения об их конформации в мембране клетки. Как правило, молекулы переносчиков состоят из 10–12 трансмембранных участков и, по-видимому, образуют канало-подобные структуры, перенос веществ через которые осуществляется путем попеременного выдвижения посадочных мест во внутриклеточную и внеклеточную среды.

Рекомендуемая литература

- Altamirano, A. A., and Russell, J. M. 1987. Coupled Na/K/Cl efflux. “Reverse” unidirectional fluxes in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 89: 669–686.
- Baker, P. F., Hodgkin, A. L., and Ridgeway, E. B. 1971. Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol.* 218: 709–755.
- Kanner, B. I. 1994. Sodium-coupled neurotransmitter transport: Structure, function and regulation. *J. Exp. Biol.* 196: 237–249.
- Schatzmann, H. J. 1989. The calcium pump of the surface membrane of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Physiol.* 51: 473–485.
- Schnetkamp, P. P. 1995. Calcium homeostasis in vertebrate retinal rod outer segments. *Cell Calcium* 18: 322–330.
- Schuldiner, S., Shirvan, A., and Linial, M. 1995. Vesicular neurotransmitter transporters: From bacteria to humans. *Physiol. Rev.* 75: 369–392.
- Simpson, P. B., Challiss, R. A. J., and Nahorski, S. R. 1995. Neuronal Ca^{2+} stores: Activation and function. *Trends Neurosci.* 18: 299–306.
- Skou, J. C. 1988. Overview: The Na,K pump. *Methods Enzymol.* 156: 1–25.
- Thomas, R. C. 1969. Membrane currents and intracellular sodium changes in a snail neurone during extrusion of injected sodium. *J. Physiol.* 201: 495–514.

Цитированная литература

1. Hodgkin, A. L., and Keynes, R. D. 1955. *J. Physiol.* 128: 28–60.
2. Caldwell, P. C., et al. 1960. *J. Physiol.* 152: 561–590.
3. Skou, J. C. 1957. *Biochim. Biophys. Acta* 23: 394–401.
4. Skou, J. C. 1988. *Methods Enzymol.* 156: 1–25.
5. Baker, P. F., et al. 1969. *J. Physiol.* 200: 459–496.
6. Thomas, R. C. 1969. *J. Physiol.* 201: 495–514.
7. Thomas, R. C. 1972. *J. Physiol.* 220: 55–71.
8. Simpson, P. B., Challiss, R. A. J., and Nahorski, S. R. 1995. *Trends Neurosci.* 18: 299–306.
9. Babcock, D. F., et al. 1997. *J. Cell Biol.* 136: 833–844.
10. Baker, P. F., Hodgkin, A. L., and Ridgeway, E. B. 1971. *J. Physiol.* 218: 709–755.
11. Tsien, R. Y. 1988. *Trends Neurosci.* 11: 419–424.
12. Miyawaki, A., et al. 1997. *Nature* 388: 882–887.
13. Persechini, A., Lynch, J. A., and Romoser, V. A. 1997. *Cell Calcium* 22: 209–216.
14. Golovina, V. A., and Blaustein, M. P. 1997. *Science* 275: 1643–1648.
15. Edes, I., and Kranias, E. G. 1995. In *Cell Physiology Source Book.* Academic Press, New York, pp. 156–165.
16. Schatzmann, H. J. 1989. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 473–485.
17. Carafoli, E. 1994. *FASEB J.* 8: 993–1002.
18. DiPolo, R., and Beaugé, L. 1979. *Nature* 278: 271–273.
19. Reuter, H., and Seitz, N. 1968. *J. Physiol.* 195: 451–470.
20. Baker, P. F., and Blaustein, M. P. 1968. *Biochim. Biophys. Acta* 150: 167–179.
21. Baker, P. F., et al. 1969. *J. Physiol.* 200: 431–458.
22. Caputo, C., Bezanilla, F., and DiPolo, R. 1989. *Biochim. Biophys. Acta* 986: 250–256.
23. Rasgado-Flores, H., Santiago, E. M., and Blaustein, M. P. 1989. *J. Gen. Physiol.* 93: 1219–1241.
24. Philipson, K. D., et al. 1996. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 779: 20–28.
25. LeBlanc, N., and Hume, J. R. 1990. *Science* 248: 372–376.
26. Lipp, P., and Niggli, E. 1994. *J. Physiol.* 474: 439–446.
27. Bridge, J. H. B., Smolley, J. R., and Spitzer, K. W. 1990. *Science* 248: 376–378.
28. Schnetkamp, P. P., Basu, D. K., and Szerencsei, R. T. 1989. *Am. J. Physiol.* 257: C153–C157.
29. Cervetto, L., et al. 1989. *Nature* 337: 740–743.
30. Schnetkamp, P. P. 1995. *Cell Calcium* 18: 322–330.
31. Inagaki, C., Hara, M., and Zeng, H. T. 1996. *J. Exp. Zool.* 275: 262–268.
32. Thomas, R. C. 1977. *J. Physiol.* 273: 317–338.
33. Payne, J. A. 1997. *Am. J. Physiol.* 273: C1516–C1525.
34. Kaplan, M. R., et al. 1996. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 649–668.
35. Russell, J. M. 1983. *J. Gen. Physiol.* 81: 909–925.
36. Altamirano, A. A., and Russell, J. M. 1987. *J. Gen. Physiol.* 89: 669–686.
37. Rohrbough, J., and Spitzer, N. C. 1996. *J. Neurosci.* 16: 82–91.
38. Schuldiner, S., Shirvan, A., and Linial, M. 1995. *Physiol. Rev.* 75: 369–392.
39. Varoqui, H., and Erickson, J. D. 1997. *Mol. Neurobiol.* 15: 165–191.
40. Schuldiner, S., Steiner-Mordoch, S., and Yelin, R. 1998. *Adv. Pharmacol.* 42: 223–227.
41. Hartinger, J., and Jahn, R. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 23122–23127.
42. Barbour, B., et al. 1994. *Neuron* 12: 1331–1343.
43. Tong, G., and Jahr, C. E. 1994. *Neuron* 13: 1195–1203.
44. Kanner, B. I. 1994. *J. Exp. Biol.* 196: 237–249.
45. Kanai, Y. 1997. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 565–572.
46. Bouvier, M., et al. 1992. *Nature* 360: 471–474.
47. Hediger, M. A., et al. 1995. *J. Physiol.* 482P: 7S–17S.
48. Mager, S., et al. 1996. *J. Neurosci.* 16: 5405–5414.
49. Attwell, D., Barbour, B., and Szatkowski, M. 1993. *Neuron* 11: 401–407.
50. Cammack, J. N., and Schwartz, E. A. 1993. *J. Physiol.* 472: 81–102.
51. Takahashi, M., et al. 1997. *J. Exp. Biol.* 200: 401–409.
52. Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. (eds.). 1996. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology.* Oxford University Press, New York, pp. 194–225.
53. Pressley, T. A. 1996. *Miner. Electrolyte Metab.* 22: 264–271.
54. Chow, D. C., and Forte, J. G. 1995. *J. Exp. Biol.* 198: 1–17.
55. Kawakami, K., et al. 1985. *Nature* 316: 733–736.
56. Noguchi, S., et al. 1986. *FEBS Lett.* 196: 315–320.
57. Anderson, J. P., and Vilsen, B. 1995. *FEBS Lett.* 359: 101–106.
58. Filoteo, A. G., et al. 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 23741–23747.
59. Nicoll, D. A., Longoni, S., and Philipson, K. D. 1990. *Science* 250: 562–565.
60. Philipson, K. D., et al. 1996. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 779: 20–28.
61. Cook, O., Low, W., and Rahamimoff, H. 1998. *Biochim. Biophys. Acta* 1371: 40–52.
62. Reiländer, H., et al. 1992. *EMBO J.* 11: 1689–1695.
63. Payne, J. A., Stevenson, T. J., and Donaldson, L. F. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 16245–16252.

64. Gillen, C., et al. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 16237–16244.
65. Alper, S. L. 1991. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 549–564.
66. Nelson, N., and Lill, H. 1994. *J. Exp. Biol.* 196: 213–228.
67. Mayser, W., Schloss, P., and Betz, H. 1992. *FEBS Lett.* 305: 31–36.
68. Palacin, M., Estuvez, R., Bertran, J., and Zorzano, A. 1998. *Physiol Rev.* 78: 969–1054.
69. McIntire, S. L., et al. 1997. *Nature* 389: 870–876.
70. Sagne, C., et al. 1997. *FEBS Lett.* 417: 177–183.

Глава 5

Ионные механизмы потенциала покоя

В состоянии покоя на мембране нейронов поддерживается постоянный электрический потенциал, при этом внутриклеточная среда заряжена отрицательно по отношению к внеклеточной. Поскольку внутри клетки больше ионов калия и меньше ионов натрия и хлора, чем снаружи, то каждый из этих ионов стремится проникнуть сквозь мембрану в направлении своего электрохимического градиента, то есть ионы калия стремятся наружу, а ионы натрия и хлора — внутрь клетки. Этому перемещению препятствует мембранный потенциал. Если представить себе упрощенную модель клетки, мембрана которой проницаема лишь для калия и хлора, то в ней возможен такой баланс между концентрационными градиентами и мембранным потенциалом, при котором суммарный ток каждого из этих ионов равен нулю. Тогда мембранный потенциал будет в точности равен равновесному потенциалу для этих двух ионов.

Если в такой модели изменить внеклеточную концентрацию калия, то изменится равновесный потенциал для калия, а следовательно и мембранный потенциал. Изменение внеклеточной концентрации хлора, напротив, приведет к соответствующему изменению его внутриклеточного уровня. При этом ни равновесный потенциал для хлора, ни мембранный потенциал не изменятся.

Мембрана реальной клетки проницаема также для натрия. В состоянии покоя ионы натрия непрерывно перемещаются внутрь клетки, снижая таким образом отрицательный заряд на мембране. Поскольку при этом калий уже не находится в равновесии, он начинает вытекать из клетки. Если бы не механизмы компенсации, то такое перемещение натрия и калия привело бы к изменению их внутриклеточных концентраций. Этого не происходит благодаря работе натрий-калиевого насоса-обменника, переносящего ионы натрия наружу и ионы калия внутрь клетки в пропорции 3 : 2. Мембранный потенциал покоя зависит от калиевого и натриевого равновесного потенциала, относительной проницаемости клеточной мембраны для этих ионов, а также от стехиометрии натрий-калиевого насоса. В состоянии покоя скорость переноса натрия и калия насосом в точности компенсирует пассивную утечку этих ионов. Натрий-калиевый обменник вносит также непосредственный вклад в мембранный потенциал (в размере нескольких милливольт), поскольку он перемещает больше положительных зарядов наружу, чем внутрь клетки.

В зависимости от механизмов транспорта, равновесный потенциал для хлора может быть как более, так и менее отрицательным по отношению к потенциалу покоя. Наличие значительной хлорной проницаемости играет важную роль в обеспечении электрической стабильности многих клеток, несмотря на то, что распределение ионов хлора не столь важно для формирования потенциала покоя.

Возникновение электрических сигналов в нервной клетке происходит в основном за счет изменения проницаемости мембраны для таких ионов, как натрий и калий. Увеличение проницаемости мембраны позволяет ионам перемещаться внутрь или наружу клетки в направлении своих электрохимических градиентов. Как показано в главе 2, изменения проницаемости зависят от активации ионных каналов. Перемещение ионов через каналы в мембране приводит к изменению заряда на ней и, следовательно, мембранного потенциала. Чтобы понять принцип возникновения электрического сигнала, необходимо уяснить сущность ионных градиентов на мембране, а также то, как они влияют на потенциал покоя.

§ 1. Идеальная клетка

Начнем с рассмотрения модели идеальной клетки, показанной на рис. 5.1. В этой клетке содержатся ионы калия, натрия и хлора, а так-

же крупные анионы. Клетка помещена в раствор, содержащий ионы натрия и калия. Другие ионы, присутствующие в реальных клетках, не играют важной роли в формировании потенциала покоя и потому не рассматриваются в данной модели. Концентрации ионов внутри и снаружи клетки приблизительно соответствуют средним величинам, полученным на клетках лягушки. В клетках птиц и млекопитающих эти значения несколько выше, а у таких морских беспозвоночных, как кальмар — значительно выше, чем у лягушки (см. табл. 5.1). В настоящей модели рассматривается клеточная мембрана, проницаемая для калия и хлора, но не для натрия и внутриклеточных анионов. Для того чтобы клетка пребывала в стабильном состоянии, необходимо выполнение трех условий:

1. Как внутриклеточная, так и внеклеточная среды должны быть электрически нейтральными. Так, например, раствор не может состоять из одних лишь ионов хлора. Отрицательный заряд этих ионов должен компенсироваться такими положительными ионами, как натрий или калий (иначе взаимное отталкивание одинаково заряженных частиц приведет к разрушению раствора).
2. Клетка должна находиться в осмотическом равновесии. В противном случае вода будет проникать в клетку (или вытекать из нее) до тех пор, пока равновесие не будет достигнуто. Осмотическое равновесие наступает при условии равенства суммарной концентрации растворенных частиц внутри и вне клетки.
3. Суммарный заряд каждого отдельно взятого иона, переносимый через мембраны клетки, должен равняться нулю.

Ионное равновесие

Как создаются и поддерживаются ионные градиенты и соответствующий электрический потенциал? На рис. 5.1 показано, что ионы находятся в положении обратной пропорциональности: ионы калия более концентрированы внутри клетки, а ионы хлора снаружи. Представим себе, что мембрана клетки проницаема только для ионов калия. Возникает вопрос, почему эти ионы не диффундируют из клетки наружу до тех пор, пока концентрации внутри и снаружи клетки не сравняются. Причина этого заключается в том, что если ионы калия покидают клетку, то снаружи накапливается положительный заряд, а внутри клетки образуется избыток заряда отрицательного. Возникший таком образом электрический потенциал снижает скорость перемещения ионов калия, а при достижении определенного уровня приводит к полному его прекращению. Это равновесный потенциал для калия (E_K). При потенциале E_K электрический градиент полностью уравновешивает градиент химический, в результате чего движение ионов прекращается. Отдельные ионы калия по прежнему втекают в клетку и вытекают из нее, но суммарный ток равен нулю. Ионы калия находятся в **равновесии**.

Условия нахождения ионов калия в равновесии те же самые, что описаны в главе 2 при рассмотрении нулевого суммарного тока через одиночный канал в небольшом участке (patch) мембраны. В этом случае концентрационный градиент уравновешивался потенциалом, при-

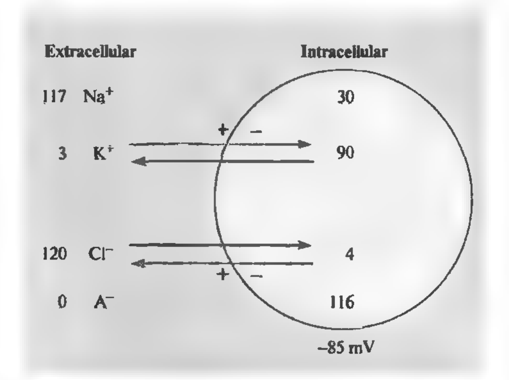


Рис. 5.1. Распределение ионов в идеальной клетке. Мембрана проницаема для K^+ и Cl^-, но непроницаема для Na^+ и внутриклеточных анионов (A^-). Концентрационный градиент ионов калия способствует выходу этих ионов из клетки (черная стрелка); градиент потенциала стремится перенести ионы калия внутрь клетки (серая стрелка). В состоянии покоя эти две силы уравновешивают друг друга. Концентрационный и электрический градиенты для хлора имеют противоположные направления. Ионные концентрации выражены в миллимолях (ммоль).

Fig. 5.1. Ion Distributions in a Model Cell. The cell membrane is impermeable to Na^+ and to the internal anion (A^-), and permeable to K^+ and Cl^-. The concentration gradient for K^+ tends to drive it out of the cell (black arrow); the potential gradient tends to attract K^+ into the cell (grey arrow). In a cell at rest the two forces are exactly in balance. Concentration and electrical gradients for Cl^- are in the reverse directions. Ion concentrations are expressed in millimolar (m*M*).

ложенным к patch-электроду. Важное отличие описываемой здесь ситуации в том, что перемещение ионов само по себе производит электрический потенциал, уравновешивающий и останавливающий это перемещение. Другими словами, равновесие в данной модели достигается автоматически и является неизбежным. Напомним, что в главе 2 равновесный потенциал для калия получался из уравнения Нернста:

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i} = 58 \log \frac{[K]_o}{[K]_i},$$

где $[K]_i$ и $[K]_o$ — внутриклеточная и внеклеточная концентрации калия, соответственно. Для клетки, изображенной на рис. 5.1, получим $E_K = -85$ мВ.

Допустим теперь, что в мембране, кроме калиевых, присутствуют еще и хлорные каналы. Поскольку для анионов $z = -1$, получим равновесный потенциал для хлора:

$$E_{Cl} = -58 \log \frac{[Cl]_o}{[Cl]_i}$$

или, пользуясь свойствами логарифма,

$$E_{Cl} = 58 \log \frac{[Cl]_i}{[Cl]_o}.$$

Для модели идеальной клетки получим соотношение концентраций хлора, которое тоже равно 1 : 30, и хлорный равновесный потенциал, равный −85 мВ. Как и в случае с калием, мембранный потенциал величиной в −85 мВ в точности уравновешивает стремление ионов хлора двигаться в направлении их концентрационного градиента, т. е. *внутрь* клетки.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что мембранный потенциал препятствует перемещению как хлора внутрь клетки, так и калия из клетки наружу. Равновесные потенциалы для двух ионов равны благодаря тому, что соотношения их внеклеточных и внутриклеточных концентраций одинаковы (1 : 30). Поскольку калий и хлор единственные ионы в нашей модели, способные проникать через мембрану клетки, и при −85 мВ оба иона находятся в равновесии, то клетка может находиться сколь угодно долго в состоянии покоя, при котором суммарное перемещение ионов в клетку и из клетки будет равно нулю.

Электрическая нейтральность

Перемещение иоиов калия наружу и ионов хлора внутрь клетки приводит к накоплению отрицательного заряда в клетке и положительного — во внеклеточном пространстве. На первый взгляд, такая ситуация противоречит принципу электрической нейтральности, однако это не так. Ионы калия, покидая клетку, накапливаются в непосредственной близости от ее мембраны, в то время как их отрицательно заряженные спутники остаются внутри клетки вблизи от внутренней поверхности той же мембраны. И те и другие фактически оказываются вне основной части раствора, как вне-, так и внутриклеточного. Также и ионы хлора, входя в цитоплазму, остаются вблизи от мембраны, а их спутники, оставленные перед проходом через мембрану, скапливаются поблизости от нее. Образуются два слоя ионов — катионов снаружи и анионов внутри клетки, которые удерживаются у мембраны благодаря взаимному притяжению. Таким образом, мембрана играет роль электрической емкости, разделяющей и запасающей заряд.

Вышесказанное не означает, что ионы калия и хлора прикованы к поверхностям мембраны. Отдельные ионы свободно обмениваются с ионами внутри- или внеклеточного раствора. Тем не менее, заряд, накопленный на мембране, остается неизменным, а растворы — нейтральными.

Интересным представляется вопрос, какую долю от общего количества ионов в клетке составляют ионы, накапливающиеся на мембране. Доля их весьма незначительна. Если предположить, что диаметр клетки составляет 25 мкм, то при концентрации 120 ммоль общее количество катионов (а следовательно, и анионов) получится $4 \cdot 10^{12}$. При мембранном потенциале −85 мВ величина заряда, разделенного мембраной, составляет приблизительно $5 \cdot 10^{11}$ одновалентных ионов на $см^2$ (глава 7). При площади поверхности клетки $8 \cdot 10^{-5}$ $см^2$ получается, что иа внутренней поверхности мембраны накапливается около $4 \cdot 10^7$ отрицательных ионов, или одна стотысячная часть общего числа ионов во внутриклеточном растворе. Следовательно, перемещение ионов калия и хлора, достаточное для создания мембранного потенциала, никак не влияет на концентрации ионов в клетке.

Влияние внеклеточного калия и хлора на мембранный потенциал

На мембранный потенциал нейронов, а также многих других клеток, влияют изменения вне-

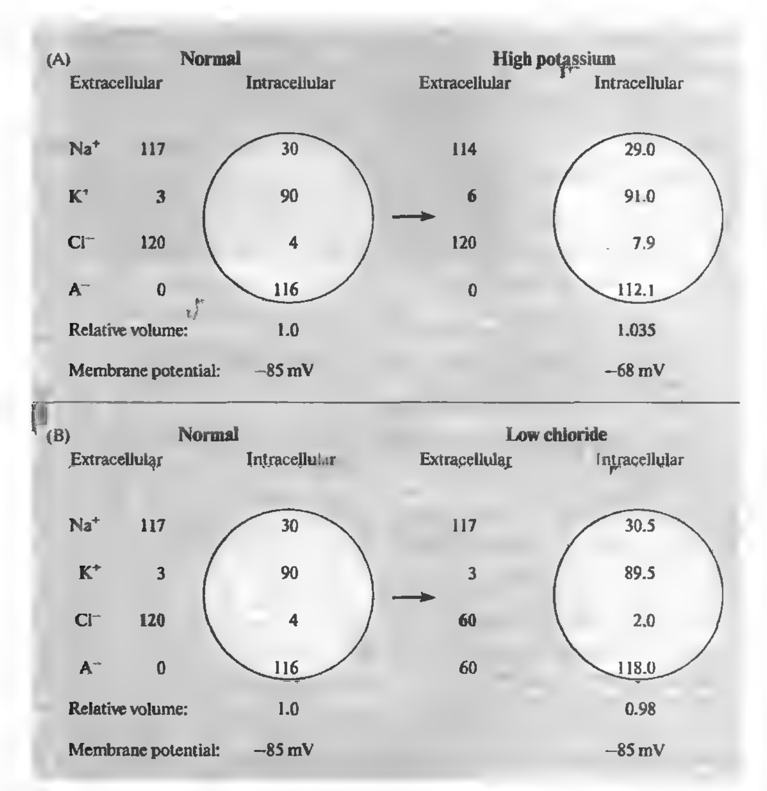


Рис. 5.2. Влияние изменений внеклеточных концентраций ионов на внутриклеточные концентрации и на мембранный потенциал. (A) Внеклеточный уровень калия удвоен, а концентрация натрия снижена с целью сохранения осмолярности на прежнем уровне. (B) Половина ионов внеклеточного хлора заменена на анионы, не проникающие через мембрану (A^-). Ионные концентрации выражены в миллимолях (ммоль); объем внеклеточного пространства рассматривается как бесконечно большой в сравнении с объемом клетки, поэтому вход и выход ионов через мембрану не изменяет их внеклеточных концентраций.

Fig. 5.2. Effects of Changing Extracellular Ion Composition on intracellular ion concentrations and on membrane potential. (A) Extracellular K^+ concentration is doubled and, to keep osmolarity constant, Na^+ concentration is reduced. (B) Half the extracellular Cl^- is replaced by an impermeant anion, A^-. Ion concentrations are in millimolar (m*M*), and extracellular volumes are assumed to be very large with respect to cell volumes, so fluxes into and out of the cell do not change extracellular concentrations.

клеточной концентрации калия, но не хлора. Обратимся к модели идеальной клетки. Сделаем допущение (для рассмотрения данной ситуации), что объем внеклеточной жидкости бесконечно велик, и что перемещение ионов не влечет за собой значительного изменения концентрации ионов вне клетки. На рис. 5.2А показаны изменения внутриклеточного ионного состава и мембранного потенциала, вызванные повышением внеклеточного уровня калия с 3 до 6 ммоль. Для сохранения первоначальной осмолярности, одновременно с добавлением 3 ммоль калия из раствора удалили 3 ммоль натрия, в результате чего общая концентрация растворенных ионов осталась на уровне 240 ммоль. Увеличение внеклеточной концентрации калия приводит к снижению его трансмембранного градиента, движущего ионы из клетки наружу. При этом на начальном этапе мембранный потенциал не меняется. В результате происходит перенос суммарного положительного заряда внутрь клетки. Вследствие накопления положительного заряда на внутренней поверхности мембраны она деполяризуется. Ионы натрия благодаря деполяризации выходят из состояния равновесия и начинают двигаться внутрь клетки. Перемещение ионов калия и хлора продол-

жается до тех пор, пока не будет достигнуто новое равновесное состояние, основанное на новом соотношении концентраций и новом уровне мембранного потенциала, в данном примере −68 мВ.

Вход калия и хлора сопровождается втоком в клетку некоторого количества воды, приводящим к небольшому увеличению объема клетки. В процессе достижения нового состояния равновесия концентрация калия возрастает с 90 до 91 ммоль, хлора — с 4 до 7,9 ммоль, а объем клетки увеличивается на 3,5 %. На первый взгляд кажется, что количество вошедшего в клетку хлора превышает количество калия, но представим себе, каковы были бы эти концентрации, если бы объем клетки не увеличился: концентрации обоих ионов были бы выше на 3,5 %. Следовательно, вместо 7,9 ммоль концентрация хлора была бы 8,2 ммоль, а концентрация калия была бы на уровне 94,2 ммоль, то есть увеличение обеих концентраций составило бы 4,2 %. Таким образом, сначала калий и хлор входят в клетку в приблизительно равных количествах (за исключением незначительного количества, необходимого для изменения заряда на мембране), а уже затем вода втекает в клетку, снижая концентрации обоих ионов до окончательного уровня.

Сходные рассуждения применимы и в случае увеличения внеклеточной концентрации хлора, с той лишь разницей, что при этом мембранный потенциал не меняется. На рис. 5.2В показан результат 50-процентного снижения концентрации хлора во внеклеточном растворе путем замены 60 ммоль хлора на другой анион, не проникающий через мембрану. Ионы хлора вытекают из клетки, тем самым деполяризуя мембрану до нового хлорного равновесного уровня (−68 мВ). Калий, выведенный из равновесия, также начинает вытекать из клетки. Как и в предыдущем примере, оба иона покидают клетку в равных количествах, увлекая за собой воду. Снижение внутриклеточного уровня калия невелико в процентном отношении, поскольку начальная его концентрация в клетке высока. Напротив, снижение внутриклеточного уровня хлора весьма существенно, и оно влечет за собой значительное изменение равновесного потенциала для хлора. По мере выхода хлора из клетки значение равновесного хлорного потенциала вновь приближается к первоначальному. Процесс продолжается до тех пор, пока равновесные потенциалы для хлора и калия не сравняются и мембранный потенциал не восстановит свое прежнее значение.

§ 2. Мембранный потенциал в аксоне кальмара

Гипотеза о том, что в основе мембранного потенциала лежит различие между внеклеточной и внутриклеточной концентрациями калия, была впервые высказана Бернштейном[1] в 1902 г. Ему не удалось проверить свое предположение экспериментально, поскольку в то время не существовало способа измерения мембранного потенциала. В наши дни можно с высокой точностью измерить мембранный потенциал, а также убедиться в том, что изменения концентрации калия внутри и снаружи клетки приводят к изменениям мембранного потенциала в соответствии с предсказаниями уравнения Нернста.

Впервые такие измерения были проведены на гигантском аксоне кальмара. Аксон этот достигает 1 ммоль в диаметре[2], что позволяет вводить в него электроды с целью прямого измерения мембранного потенциала (рис. 5.3А). Более того, аксон кальмара удивительно живуч и продолжает функционировать, даже если из него выдавить цитоплазму с помощью резинового валика и заменить ее на перфузионный раствор (рис. 5.3В и С). У исследователя есть возможность контролировать ионный состав как внеклеточного, так и внутриклеточного растворов. А. Л. Ходжкин, вместе с А. Ф. Хаксли впервые поставивший многие эксперименты на аксоне кальмара (за которые они позже были удостоены Нобелевской премии), однажды сказал[3]:

> *Можно утверждать, что введение Юнгом в 1936 году препарата аксона кальмара имело для науки об аксоне большее значение, чем какое-либо другое открытие, сделанное за последние 40 лет. Один выдающийся нейрофизиолог заметил недавно во время ужина на одном из конгрессов (не самым тактичным образом, должен признать): «Если честно, Нобелевскую премию нужно было присвоить кальмару».*

Концентрации основных ионов в крови кальмара, а также в цитоплазме его аксона, приведены в табл. 5.1 (такие ионы, как магний и внутриклеточные анионы, опущены). Эксперименты на изолированном аксоне обычно проводятся в морской воде, соотношение концентраций калия во внутриклеточной и внеклеточной средах составляет при этом 40 : 1.

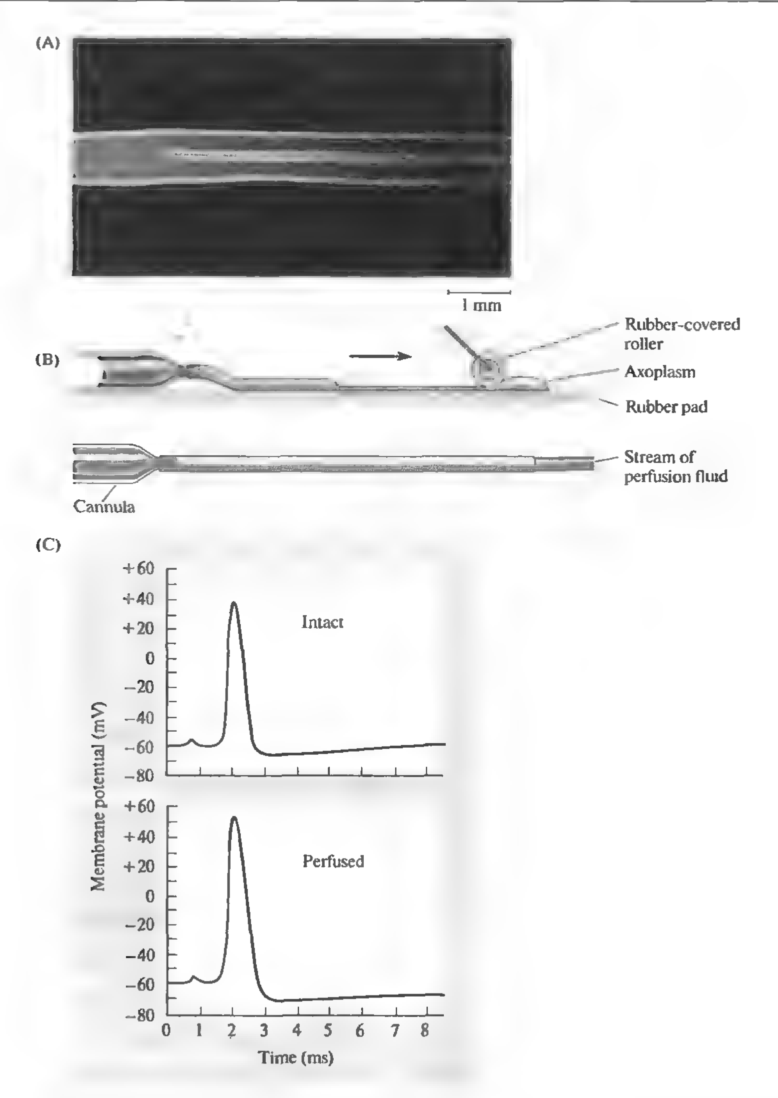


Рис. 5.3. Электрическое отведение от аксона кальмара. (A) Фотография изолированного аксона кальмара с введенным в него электродом. (B) Удаление аксоплазмы из аксона, который затем наполняется внутриклеточным перфузионным раствором. (C) Сопоставление отведений после (perfused) и до (intact) перфузии показывает, что удаление аксоплазмы не влияет как на потенциал покоя, так и на потенциал действия.

Fig. 5.3. Recording from a Squid Axon. (A) Isolated giant axon of the squid, with axial recording electrode inside. (B) Extrusion of axoplasm from the axon, which is then cannulated and perfused internally. (C) Comparison of records before (intact) and after perfusion shows that the resting and action potentials are unaffected by removal of the axoplasm. (A from Hodgkin and Keynes, 1956; B and C after Baker, Hodgkin, and Shaw, 1962.)

Если бы мембранный потенциал был равен равновесному потенциалу для калия, его значение было бы −93 мВ. В действительности мембранный потенциал гораздо менее отрицателен (от −65 до −70 мВ). С другой стороны, это значение более отрицательно, чем равновесный потенциал для хлора (+55 мВ).

Гипотеза Бернштейна была проверена путем измерения потенциала покоя и сравнения его с калиевым равновесным потенци-

Таблица 5.1. Концентрации ионов снаружи и внутри аксонов кальмара.

Table 5.1. Concentrations of ions inside and outside freshly isolated axons of squid.

Ion	Concentration (ммоль)		
	Axoplasm	Blood	Seawater
Potassium	400	20	10
Sodium	50	440	460
Chloride	60	560	540
Calcium	0,1 мкМ[a]	10	10

Source: After Hodjkin, 1964.

[a] Ionized intracellular calcium from Baker, Hodgkin, and Ridgeway, 1971.

алом при различных значениях внеклеточной концентрации калия. Заметим, что, как и в случае модели идеальной клетки, изменения уровня калия снаружи не влекут за собой значительных изменений его внутриклеточной концентрации. Из уравнения Нернста следует, что изменение концентрационного градиента в 10 раз при комнатной температуре приведет к изменению мембранного потенциала на 58 мВ. Результат эксперимента по варьированию внеклеточного уровня калия показан на рис. 5.4. На оси абсцисс представлен логарифм внеклеточной концентрации калия, а на оси ординат — мембранный потенциал. Теоретически предсказанный угол наклона кривой (соответствующий изменению потенциала на 58 мВ при десятикратном изменении концентрации и показанный прямой линией) в действительности достигается лишь при сравнительно высоких концентрациях. Чем ниже концентрация калия, тем меньше угол наклона кривой. Данные показывают, что распределение ионов калия не является единственным фактором, формирующим мембранный потенциал.

Роль натриевой проницаемости

Из экспериментов на аксоне кальмара можно заключить, что гипотеза, высказанная Бернштейном в 1902 г., была близка к истине: трансмембранный градиент калия является важным, хотя и не единственным фактором, влияющим на мембранный потенциал. Чем можно объяснить отклонение экспериментальной кривой, показанной на рис. 5.4, от уравнения Нернста? Оказывается, для этого достаточно снять ограничение с модели, состоящее в том, что мембрана непроницаема для ионов натрия. Мембрана реальной клетки действительно обладает натриевой проницаемостью, которая составляет от 1 до 10 % калиевой.

Для рассмотрения роли натриевой проницаемости обратимся к модели идеальной клетки и временно исключим из поля зрения перемещение ионов хлора. Мембранный потенциал равен калиевому равновесному потенциалу, поэтому перемещение суммарного заряда через мембрану отсутствует, клетка находится в покое. Если теперь ввести в модель натриевую проницаемость, то натрий будет стремиться войти в клетку благодаря как своему концентрационному градиенту, так и мембранному потенциалу. По мере входа натрия на внутренней поверхности мембраны накапливается положительный заряд и мембрана деполяризуется. В результате ионы калия выходят из равновесия и начинают покидать клетку. С увеличением деполяризации мембраны движущая сила для входа натрия снижается, в то время как движущая сила для выхода калия возрастает. Процесс продолжается до тех пор, пока оба ионных потока не уравновесят друг друга. В этот момент изменение мембранного потенциала прекращается, поскольку какое-либо накопление заряда отсутствует. Вообще говоря, значение мембранного потенциала расположено между калиевым и натриевым равновесными потенциалами и определяется равновесием между калиевым и натриевым токами, равными по величине и направленными в противоположные стороны.

Ионы хлора также участвуют в этом процессе, однако, как мы убедились ранее, равновесный потенциал для хлора подстраивается под новое значение мембранного потенциала за счет изменения внутриклеточной концентрации этого иона. По мере того как токи катионов постепенно приходят в равновесие, внутриклеточный уровень хлора возрастает до тех пор, пока суммарный хлорный ток не станет равным нулю.

Уравнение постоянного поля

Для того чтобы вычислить точное значение мембранного потенциала для модели идеальной клетки, необходимо принять во внимание отдельные ионные токи, протекающие через мембрану. Входящий натриевый ток (i_{Na}) зависит от величины движущей силы для ионов натрия ($V_m - E_{Na}$) (глава 2), а также от натриевой проводимости мембраны (g_{Na}). Проводи-

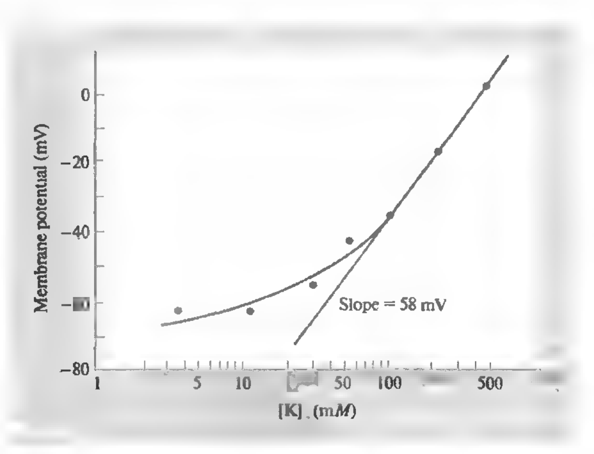


Рис. 5.4. Зависимость мембранного потенциала от внеклеточной концентрации калия на аксоне кальмара (полу-логарифмическая шкала). Прямая линия проведена под углом наклона, равным 58 мВ на десятикратное изменение внеклеточного уровня калия, в соответствии с уравнением Нернста. Благодаря наличию мембранной проницаемости для натрия, экспериментальные данные расходятся с прямой линий, особенно при низких концентрациях калия.

Fig. 5.4. Membrane Potential versus External Potassium Concentration in squid axon, plotted on a semilogarithmic scale. The straight line is drawn with a slope of 58 mV per 10-fold change in extracellular potassium concentration, according to the Nernst equation. Because the membrane is also permeable to sodium, the points deviate from the straight line, especially at low potassium concentrations. (After Hodgkin and Keynes, 1955.)

мость пропорциональна среднему количеству натриевых каналов, находящихся в открытом состоянии при потенциале покоя: чем больше открытых каналов, тем выше проводимость. Таким образом, натриевый ток равен:

$$i_{Na} = g_{Na}(V_m - E_{Na}).$$

Тот же подход справедлив и для калия и хлора:

$$i_K = g_K(V_m - E_K),$$
$$i_{Cl} = g_{Cl}(V_m - E_{Cl}).$$

Если принять $i_{Cl} = 0$ (т. е. ионы хлора находятся в равновесии), то, для сохранения неизменного значения мембранного потенциала, калиевый и натриевый токи должны быть равны по величине и противоположны по направлению:

$$g_K(V_m - E_K) = -g_{Na}(V_m - E_{Na}).$$

Рассмотрим это уравнение более подробно. Предположим, что g_K значительно больше g_{Na}. Тогда, для того чтобы токи были равны, движущая сила для выхода калия должна быть значительно меньше движущей силы для натриевого входа. Другими словами, мембранный потенциал должен быть ближе к E_K, чем к E_{Na}. Соответственно, если значение g_{Na} велико, то мембранный потенциал будет ближе к E_{Na}.

Преобразовав выражение, получим формулу для мембранного потенциала:

$$V_m = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na}}{g_K + g_{Na}}.$$

Если по той или иной причине ионы хлора не находятся в равновесии, то формула приобретает несколько более сложный вид:

$$V_m = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na} + g_{Cl} E_{Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}}.$$

Вышеприведенные расчеты были первоначально проведены Голдманом[4] и, независимо от него, Ходжкином и Катцем[5], с той лишь разницей, что вместо равновесных потенциалов и проводимостей они оперировали ионными *концентрациями* снаружи ($[Na]_o, \ldots$) и внутри ($[Na]_i, \ldots$) клетки, а также *проницаемостью* мембраны для каждого из ионов ($p_{Na}, \ldots$):

$$V_m = 58 \log \frac{p_K[K]_o + p_{Na}[Na]_o + p_{Cl}[Cl]_i}{p_K[K]_i + p_{Na}[Na]_i + p_{Cl}[Cl]_o}.$$

Так же как и ранее, хлорные компоненты выражения не рассматриваются, если ионы хлора находятся в равновесии. Уравнение называется «уравнением ГХК» по фамилиям авторов, или **уравнением постоянного поля**, поскольку одним из допущений при выводе уравнения является равномерное распределение градиента напряжения (т. е. «поля») на всем протяжении мембраны. Уравнение ГХК полностью аналогично уравнению проводимостей, на его основании можно сделать те же предсказания: когда проницаемости для натрия и хлора малы по сравнению с калиевой проницаемостью, хлорный и натриевый компоненты уравнения становятся пренебрежимо малы, и мембранный потенциал стремится к значению равновесного потенциала для

калия: $V_m = 58 \log([K]_o/[K]_i)$. При увеличении натриевой проницаемости мембранный потенциал сдвигается в сторону натриевого равновесного потенциала.

Из уравнения постоянного поля следует один важный принцип. Мембранный потенциал зависит от проводимости (или проницаемости) мембраны для важнейших ионов, а также от их равновесных потенциалов. В реальных клетках проводимости для калия и хлора сравнительно высоки, поэтому потенциал покоя клетки близок к равновесным потенциалам для этих двух ионов. При увеличении натриевой проводимости, например, во время потенциала действия (глава 6) или возбуждающего постсинаптического потенциала (глава 9), мембранный потенциал сдвигается в сторону натриевого равновесного потенциала.

Потенциал покоя

Несмотря на то, что во многих случаях уравнение ГХК весьма полезно, оно не дает возможности правильно вычислить потенциал покоя. Дело в том, что условие равенства суммарного тока нулю неправомочно: третье условие равновесия, а именно требование, чтобы *каждый* отдельный ионный ток равнялся нулю, не выполняется. В результате клетка будет постепенно терять калий и наполняться натрием и хлором. В реальных клетках концентрации натрия и калия поддерживаются на постоянном уровне при помощи натрий-калиевых насосов (глава 4). В противовес непрерывному потоку натрия внутрь клетки и калия наружу, эти насосы переносят оба эти иона в определенной пропорции в направлении, противоположном их пассивному движению (рис. 5.5). Следовательно, для поддержания клетки в **стабильном состоянии** затрачивается метаболическая энергия.

Чтобы получить более полную формулу потенциала покоя, необходимо принять во внимание как пассивное движение ионов, так и их активный транспорт, осуществляемый насосами. Рассмотрим сначала пассивное движение ионов натрия и калия через мембрану:

$$i_{Na} = g_{Na}(V_m - E_{Na}), \quad i_K = g_K(V_m - E_K).$$

Отказавшись от предположения о том, что токи эти равны по величине и противоположны по направлению, но зная соотношение между ними, можно получить уравнение

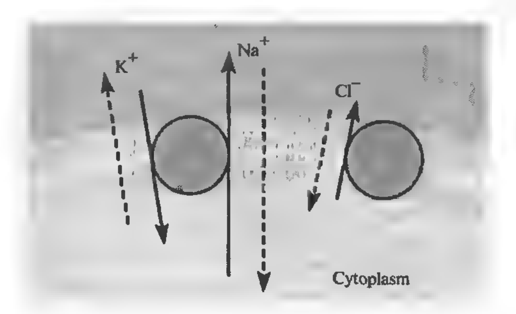


Рис. 5.5. Пассивные ионные токи и работа насосов в состоянии покоя. Пунктирные стрелки указывают направление пассивного движения ионов через мембрану клетки, а сплошные — направление переноса ионов транспортными системами. Длина стрелки отражает относительную величину суммарного переноса заряда. Суммарный ток дяя каждого иона равен нулю. Например, суммарный пассивный вход натрия равен по величине транспорту этого иона из клетки наружу. Транспорт Na : K осуществляется в соотношении 3 : 2. В зависимости от конкретной клетки транспорт хлора может быть выходящим (как показано на рисунке) или входящим.

Fig. 5.5. Passive Ion Fluxes and Pumps in a Steady State. Net passive ion movements across the membrane are indicated by dashed arrows, transport systems by solid arrows and circles. Lengths of arrows indicate the relative magnitudes of net ion movements. Total flux is zero for each ion. For example, the net inward leak of Na^+ is equal to the rate of outward transport. Na : K transport is coupled with a ratio of 3 : 2. In any particular cell, Cl^- transport may be outward (as shown) or inward.

мембранного потенциала, исходя из равновесных потенциалов для натрия и калия, а также их относительных проводимостей. Здесь уже нужно учитывать влияние насоса. Поскольку насос поддерживает внутриклеточные концентрации натрия и калия на постоянном уровне, перенося ионы в соотношении 3 : 2, то и пассивные токи должны находиться в том же соотношении: $i_{Na}/i_K = 3/2$. Имеем следующее выражение:

$$\frac{i_{Na}}{i_K} = \frac{g_{Na}(V_m - E_{Na})}{g_K(V_m - E_K)} = -1{,}5.$$

Соотношение имеет отрицательную величину, потому что направления натриевого и калиевого токов противоположны. Преобразовав выражение, получим:

$$V_m = \frac{1{,}5 g_K E_K + g_{Na} E_{Na}}{1{,}5 g_K + g_{Na}}.$$

Это уравнение похоже на полученное выше для модели идеальной клетки, и на его

основании можно сделать то же предсказание: значение мембранного потенциала будет определяться относительными величинами g_{Na} и g_K. Отличие настоящей формулы состоит в том, что члены, относящиеся к калию, умножены на 1,5. Благодаря этому фактору мембранный потенциал будет ближе к E_K. Таким образом, движущая сила для входа натрия возрастает, а для выхода калия, наоборот, уменьшается. В результате и пассивные токи натрия и калия будут находиться в соотношении 3 : 2, а не 1 : 1.

Обобщая вышесказанное, можно сделать вывод, что потенциал покоя — это такое значение мембранного потенциала, при котором входящий натриевый ток не равен по величине выходящему калиевому, а превосходит его в 1,5 раза. Пассивные токи обоих ионов определяются их равновесными потенциалами и проводимостями, в то время как соотношение токов 3 : 2 продиктовано стехиометрическими характеристиками насоса.

Задачу по выводу формулы потенциала покоя для реальных клеток впервые взяли на себя Муллинс и Нода[6]. С помощью внутриклеточных микроэлектродов они исследовали влияние изменения ионных концентраций на мембранный потенциал мышечной клетки. Подобно Голдману, Ходжкину и Катцу, они получили выражение, связывающее мембранный потенциал с проницаемостями и концентрациями отдельных ионов. Результат аналогичен только что полученному нами уравнению, основанному на проводимостях и равновесных потенциалах:

$$V_m = 58 \log \frac{rp_K[K]_o + p_{Na}[Na]_o}{rp_K[K]_i + p_{Na}[Na]_i},$$

где r — абсолютное значение соотношения ионного транспорта (3 : 2). Уравнение точно описывает потенциал покоя при условии, что все остальные ионы, проникающие сквозь мембрану (такие как хлор), находятся в равновесии.

Распределение хлора

Насколько применимы подобные рассуждения для хлора? Как и для других ионов, суммарный ток хлора должен быть равен нулю. Как показано выше (рис. 5.2B), равновесие ионов хлора достигается путем простого изменения его внутриклеточной концентрации, без изменения при этом мембранного потенциала. Тем не менее, во многих клетках существуют транспортные системы для хлора (глава 4). В аксоне кальмара и в мышце активные транспортные системы переносят ионы хлора внутрь клетки; во многих нервных клетках, напротив, хлор выводится из клетки (см. рис. 5.5). В результате активного транспорта хлора в клетку, его внутриклеточная концентрация возрастает, что приводит к усилению выходящего пассивного тока утечки хлора, равного по величине активному входящему току[7]. Транспорт хлора из клетки наружу производит обратное действие.

Электрическая модель мембраны

Для тех, кто предпочитает иметь дело с электрическими схемами, вышеприведенные рассуждения показаны на рис. 5.6 в обобщенном виде. Потенциалы E_{Na}, E_K и E_{Cl} показаны в виде батарей, а проводимости для натрия, калия и хлора изображены в виде сопротивлений (резисторов). Пассивные токи через сопротивления равны и противоположны токам, генерируемым соответствующими насосами, поэтому суммарный ток через мембрану для каждого иона равен нулю.

Ожидаемые значения мембранного потенциала

Можно ли, основываясь на вышеприведенных соображениях, объяснить нелинейную зависимость мембранного потенциала от концентрации калия, показанную на рис. 5.4? Ответ станет очевидным, если подставить в формулу реальные значения. Для аксона кальмара соотношение констант проницаемости для натрия и калия приблизительно равно 0,04 : 1,0.[5] Воспользовавшись этими данными, а также значениями ионных концентраций из табл. 5.1, получим потенциал покоя в морской воде:

$$V_m = 58 \log \frac{(1{,}5)(10) + (0{,}04)(460)}{(1{,}5)(400) + (0{,}04)(50)} = -73 \text{ мВ}.$$

Становится очевидным, почему при изменении внеклеточной концентрации калия мембранный потенциал не строго подчиняется уравнению Нернста для калия, как показано на рис. 5.4. Если сравнить слагаемые в знаменателе, относящиеся к калию ($1{,}5 \times 10 = 15$) и к натрию ($0{,}04 \times 460 = 18{,}4$), то получится, что вклад калия составляет всего около 45 %. По этой причине, увеличение внеклеточной концентрации калия вдвое не приведет к удвоению числителя (как было бы

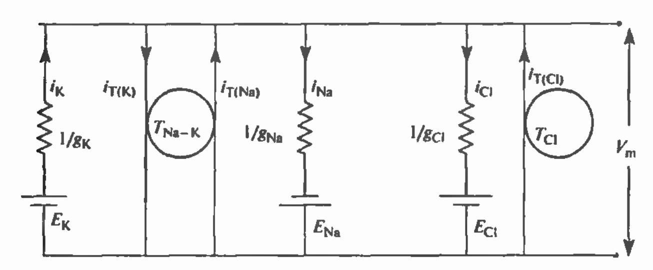


Рис. 5.6. Электрическая схема мембраны клетки в состоянии равновесия, показанном на рис. 5.5. E_K, E_{Na} и E_{Cl} — потенциалы Нернста для соответствующих ионов. Отдельные ионные проводимости представлены в виде сопротивлений (величина которых равна $1/g$ для каждого иона). Отдельные ионные токи ($i_K, \dots$) равны по величине и противоположны по направлению токам, генерируемым натрий-калиевым обменником (T_{Na-K}) и хлорным насосом (T_{Cl}), поэтому суммарный ток через мембрану для каждого иона равен нулю. V_m — устанавливающийся в результате мембранный потенциал.

Fig. 5.6. Electrical Model of the Steady-State Cell Membrane shown in Figure 5.5. E_K, E_{Na}, and E_{Cl} are the Nernst potentials for the individual ions. The individual ion conductances are represented by resistors (having a resistance of $1/g$ for each ion). The individual ion currents (i_K, i_{Na}, and i_{Cl}) are equal and opposite to the currents ($i_{T(K)}$, $i_{T(Na)}$, and $i_{T(Cl)}$) supplied by the sodium-potassium exchange pump (T_{Na-K}), and the chloride pump (T_{Cl}), so the net flux of each ion across the membrane is zero. The resulting membrane potential is V_m.

в случае полного соответствия с уравнением Нернста), и, следовательно, эффект изменения уровня калия на мембранный потенциал меньше, чем в идеальной ситуации, когда калий является единственным проводящим ионом. Когда внеклеточная концентрация калия возрастает до существенных значений (100 ммоль на рис. 5.4), то роль калиевого компонента в знаменателе становится подавляющей, и кривая зависимости приближается к своему теоретическому углу наклона (58 мВ на 10-кратное увеличение концентрации калия). Этот эффект усиливается благодаря свойству калиевых каналов, обсуждавшемуся в главе 3. Многие калиевые каналы обладают чувствительностью к мембранному потенциалу и открываются при деполяризации, вызванной увеличением внеклеточной концентрации калия. В результате подобного увеличения проницаемости для калия вклад натрия в формирование мембранного потенциала дополнительно снижается.

Вообще, потенциал покоя нервных клеток приблизительно равен −70 мВ. В некоторых клетках, например в скелетной мышце позвоночных[8], потенциал покоя может быть −90 мВ или даже больше, что объясняется значительным превосходством калиевой проводимости над натриевой. Натриевая проводимость глиальных клеток настолько мала, что их потенциал покоя практически равен калиевому равновесному потенциалу (глава 8). В таких клетках, как, например, нейроны ганглиев пиявки[9] или рецепторы сетчатки[10], натриевая проводимость достаточно велика, а потенциал покоя составляет всего −40 мВ.

Вклад натрий-калиевого насоса в мембранный потенциал

Натрий-калиевый насос является электрогенным, потому что за каждый цикл его работы из клетки выводится один суммарный положительный заряд, тем самым увеличивая отрицательный заряд на внутренней поверхности мембраны клетки. Насколько велик этот вклад в заряд на мембране? Чтобы ответить на этот вопрос, представим себе, что насос не электрогенен, а нейтрален, то есть соотношение ионов, переносимых насосом внутрь и наружу клетки, равно единице. С учетом этого условия проведем вычисления:

$$V_m = 58 \log \frac{(1{,}0)(10) + (0{,}04)(460)}{(1{,}0)(400) + (0{,}04)(50)} = -67 \text{ мВ}.$$

Поскольку полученный потенциал покоя на 6 мВ менее отрицателен, то можно сделать вывод о том, что вклад насоса в потенциал покоя равен −6 мВ. При условии транспорта ионов в соотношении 3 : 2 вклад насоса в потенциал покоя не может превысить −11 мВ[11]. При остановке ионообмена его влияние на величину потенциала покоя прекращается, и потенциал покоя постепенно снижается по мере накопления в клетке ионов натрия и выхода из нее калия.

Ионные каналы, участвующие в формировании потенциала покоя

Наличие проводимости для натрия, калия и хлора в состоянии покоя было показано во многих клетках. Интересно отметить, что ионные каналы, обеспечивающие эти проводимости, до сих пор не были определены ни в одном типе клеток. Кандидаты

на роль калиевых каналов, активных в диапазоне потенциала покоя, различны в зависимости от типа клеток. Среди них есть каналы, активируемые внутриклеточными катионами: натрий-активируемые и кальций-активируемые калиевые каналы. Кроме того, многие нервные клетки обладают так называемым калиевым каналом типа «М», которые открыты при потенциале покоя и закрываются при участии внутриклеточных посредников (глава 16). Активация большого количества потенциалзависимых калиевых каналов (то есть «замедленного выпрямителя» — delayed rectifier, и каналов типа «А») при потенциале покоя маловероятна. Однако, даже 0,1–1% от их общего числа было бы достаточно, чтобы создать проводимость, сравнимую с проводимостью в покое[12].

Конкретные носители натриевой проводимости в нервных клетках также неизвестны. В некоторой степени, вход натрия может происходить через калиевые каналы, для большинства из которых проницаемость для натрия составляет от 1 до 3% от калиевой проницаемости[13]. Кроме того, открытые катионные каналы могут способствовать как выходу калия, так и входу натрия, поскольку большая часть этих каналов не обладает высокой селективностью к калию по сравнению с натриевой[14, 15]. Дополнительный источник входящего в клетку натрия — это натрийзависимые вторичные активные транспортные системы (глава 4). Наконец, потенциалчувствительные натриевые каналы также вносят свой вклад в натриевую проводимость в покое, поскольку эта проводимость блокируется тетродотоксином, хотя и в небольшой степени[9].

Хлорные каналы семейства CLC (глава 3) широко распространены в нервных и мышечных клетках. Наличие хлорных каналов обеспечивает стабилизацию мембранного потенциала (см. ниже). Эти каналы также участвуют в установлении внутриклеточной концентрации хлора, взаимодействуя с системами хлорного транспорта[16, 17]. При низком уровне экспрессии каналов CLC, например, в нейронах эмбрионального гиппокампа, значение E_{Cl} менее отрицательно по сравнению с потенциалом покоя, благодаря вкладу активного транспорта ионов хлора внутрь клетки и их накоплению в цитоплазме. В нейронах взрослого животного экспрессия каналов CLC более выражена, и мембранная проводимость для хлора выше, поэтому накопление внутриклеточного хлора невозможно, и E_{Cl} равен мембранному потенциалу. В клетках центральной нервной системы до 10% проводимости мембраны при потенциале покоя обеспечивается за счет хлорных каналов[18].

§ 3. Изменения мембранного потенциала

Необходимо помнить, что, обсуждая потенциал покоя, мы всегда говорим о состоянии равновесия. Например, выше было сказано, что изменение внеклеточной концентрации хлора не оказывает значительного влияния на мембранный потенциал, потому что внутриклеточная концентрация при этом подстраивается под новые условия. В конце концов это действительно происходит, но процесс занимает какое-то время, и в течение этого времени изменение внеклеточного уровня хлора оказывает влияние на мембранный потенциал.

Равновесный мембранный потенциал представляет собой тот фоновый уровень, на котором происходят все изменения мембранного потенциала. Как они происходят? Обычно кратковременные изменения мембранного потенциала (подобные тем, которые наблюдаются при взаимодействии нейронов между собой) происходят за счет временных изменений проницаемости мембраны. Как мы знаем из уравнения постоянного поля, увеличение натриевой проницаемости (также как и снижение калиевой) приводит к деполяризации, то есть к смещению мембранного потенциала в сторону натриевого равновесного потенциала. Напротив, увеличение калиевой проницаемости вызывает гиперполяризацию. Еще один важный для сигнальных процессов клетки ион — это кальций. Внутриклеточная концентрация кальция очень низка (глава 4), а E_{Ca} в большинстве клеток превышает +150 мВ. Следовательно, увеличение кальциевой проницаемости должно приводить к входу кальция в клетку и деполяризации мембраны.

Особый интерес представляет влияние хлорной проницаемости на мембранный потенциал. Как было отмечено выше, хлор вносит незначительный вклад в потенциал покоя. Внутриклеточная концентрация хлора подстраивается под новые условия за счет работы существующих хлорных транспортных механизмов. Влияние кратковременного увеличе-

ния хлорной проницаемости может выражаться как в гиперполяризации, так и в деполяризации, в зависимости от того, положителен или отрицателен E_{Cl} по отношению к потенциалу покоя. Это, в свою очередь, зависит от работы транспортного механизма, либо наполняющего клетку хлором, либо выводящего его наружу. В любом случае, влияние хлора на мембранный потенциал обычно невелико. Тем не менее, увеличение хлорной проницаемости может иметь важное значение для регулирования сигнальных процессов, поскольку оно поддерживает мембранный потенциал в диапазоне E_{Cl} и за счет этого ослабляет способность других процессов изменить мембранный потенциал.

Поддержание мембранного потенциала на неизменном уровне играет важную роль в регуляции возбудимости таких клеток, как скелетная мышца, хлорная проводимость которой в покое достаточно велика. В таких клетках кратковременный вход положительных ионов вызовет меньшую деполяризацию в присутствии хлорной проницаемости, нежели в ее отсутствии, поскольку их вход отчасти балансируется входом хлора через уже открытые каналы. Мутации хлорных каналов, снижающие хлорную проницаемость мембраны, приводят к некоторым мышечным заболеваниям. Потерявшие нормальную высокую хлорную проводимость мышцы находятся в состоянии повышенной возбудимости (myotonic)[19, 20].

Выводы

- Нервные клетки обладают высокой внутриклеточной концентрацией калия и низкой концентрацией натрия и хлора, так что калий стремится выйти из клетки, а натрий и хлор стремятся войти в нее. Стремлению калия и хлора проникнуть через мембрану в направлении концентрационного градиента противостоит мембранный потенциал.
- В модели идеальной клетки, обладающей только калиевой и натриевой проводимостями, мембранный потенциал может в точности уравновесить концентрационные градиенты таким образом, чтобы суммарный ток обоих ионов равнялся нулю. В этом случае мембранный потенциал соответствует равновесному потенциалу для калия и хлора.
- Изменение внеклеточного уровня калия приводит к изменению его равновесного потенциала и, следовательно, мембранного потенциала. Напротив, изменение внеклеточной концентрации хлора приводит в конечном итоге к изменению его внутриклеточного уровня, так что сдвиг хлорного равновесного потенциала и мембранного потенциала от своих первоначальных значений носит кратковременный характер.
- Мембрана реальных клеток обладает также натриевой проводимостью. В результате в состоянии покоя происходит постоянная диффузия натрия внутрь, а калия наружу клетки. Эти токи в точности уравновешиваются активным ионным транспортным механизмом — натрий-калиевым насосом, работающим по схеме 3 иона натрия к 2 ионам калия. В этих условиях, величина мембранного потенциала зависит от натриевого и калиевого равновесных потенциалов, относительных проводимостей для этих ионов, а также от соотношения ионов в цикле насоса.
- Благодаря тому, что натрий-калиевый насос переносит больше положительных ионов наружу, чем внутрь клетки, он вносит непосредственный вклад в мембранный потенциал в размере нескольких мВ.
- В зависимости от особенностей хлорных транспортных механизмов, равновесный потенциал для хлора может быть как более, так и менее отрицательным по отношению к потенциалу покоя. Несмотря на незначительное влияние распределения хлора на потенциал покоя, наличие высокой хлорной проводимости необходимо для поддержания электрической стабильности клетки.

Рекомендуемая литература

◇ Hodgkin, A. L., and Katz, B. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108: 37–77. (The constant field equation is derived in Appendix A of this paper.)

◇ Junge, D. 1992. *Nerve and Muscle Excitation*, 3rd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, Chapters 1–3.

◇ Mullins, L. J., and Noda, K. 1963. The influence of sodium-free solutions on membrane potential of frog muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 47: 117–132.

Цитированная литература

1. Bernstein, J. 1902. *Pflügers Arch.* 92: 521–562.
2. Young, J. Z. 1936. *Q. J. Microsc. Sci.* 78: 367–386.
3. Hodgkin, A. L. 1973. *Proc. R. Soc. Lond. B* 183: 1–19.
4. Goldman, D. E. 1943. *J. Gen. Physiol.* 27: 37–60.
5. Hodgkin, A. L., and Katz, B. 1949. *J. Physiol.* 108: 37–77.
6. Mullins, L. J., and Noda, K. 1963. *J. Gen. Physiol.* 47: 117–132.
7. Matthews, G., and Wickelgren, W. O. 1979. *J. Physiol.* 293: 393–414, Appendix (by A. R. Martin).
8. Fatt, P., and Katz, B. 1951. *J. Physiol.* 115: 320–370.
9. Nicholls, J. G., and Baylor, D. A. 1968. *J. Neurophysiol.* 31: 740–756.
10. Baylor, D. A., and Fuortes, M. G. F. 1970. *J. Physlol.* 207: 77–92.
11. Martin, A. R., and Levinson, S. R. 1985. *Muscle Nerve* 8: 354–362.
12. Edwards, C. 1982. *Neuroscience* 7: 1335–1366.
13. Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, p. 352.
14. Yellen, G. 1982. *Nature* 296: 357–359.
15. Chua, M., and Betz, W. J. 1991. *Biophys. J.* 59: 1251–1260.
16. Staley, K., et al. 1996. *Neuron* 17: 543–551.
17. Mladinić, M., et al. 1999. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 1207–1213.
18. Gold, M. R., and Martin, A. R. 1983. *J. Physiol.* 342: 99–117.
19. Barchi, R. L. 1997. *Neurobiol. Dis.* 4: 254–264.
20. Cannon, S. C. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 3–10.

Глава 6

Ионные механизмы потенциала действия

Количественное описание механизмов, участвующих в генерации потенциала действия, стало возможным благодаря методу измерения мембранных токов в условии фиксации потенциала. Этот метод позволяет определить, какой вклад вносят ионы того или иного типа в мембранный ток, а также вычислить величину и временной ход изменений соответствующих ионных проводимостей. Активация натриевой проводимости носит кратковременный характер, за ней следует инактивация. Увеличение калиевой проводимости продолжается до тех пор, пока не закончится деполяризация. Именно зависимость натриевой и калиевой проводимостей от мембранного потенциала и их попеременная активация качественно определяют как амплитуду, так и временной ход потенциала действия, равно как и другие мембранные характеристики, включая порог и рефрактерный период.

Исследование проводимостей одиночных калиевых и натриевых каналов во время потенциала действия проводились в условиях фиксации потенциала участка мембраны. Наблюдаемые при этом принципы работы отдельных каналов соответствуют результатам, полученным ранее в экспериментах с фиксацией потенциала целой клетки: при деполяризации вероятность открытия натриевых и калиевых каналов возрастает. Возрастание вероятности происходит с тем же временным ходом, что и соответствующие токи в условиях фиксации потенциала. Так, натриевые каналы наиболее часто открываются в начале деполяризующего импульса и вероятность таких открытий падает по мере развития натриевой инактивации.

В генерации потенциала действия могут принимать участие и другие катионные каналы. В некоторых клетках фаза роста потенциала действия определяется активацией кальциевых каналов, а реполяризация происходит благодаря активации различных типов калиевых каналов.

§ 1. Натриевые и калиевые токи

В главе 5 было продемонстрировано, что потенциал покоя зависит главным образом от разности концентраций калия (как было предложено Бернштейном в 1902 году), и, в меньшей степени, от концентраций натрия и хлора. Одновременно с созданием Бернштейном теории потенциала покоя, Овертон[1] сделал важное открытие: он показал, что для генерации нервом потенциала действия необходим натрий, и сделал робкое предположение о том, что основой потенциала действия является вход ионов натрия в клетку. Развитие эта гипотеза получила благодаря опытам на аксоне кальмара.

В 1939 году Ходжкин и Хаксли[2] показали, что на пике потенциала действия происходит кратковременная смена знака («овершут») потенциала на внутренней стороне мембраны в область положительных значений. Это наблюдение подтвердило участие натрия в потенциале действия, поскольку вход натрия в клетку происходит и при положительных значениях мембранного потенциала вплоть до натриевого равновесного потенциала E_{Na}. Спустя десятилетие Ходжкин и Катц[3] добились уменьшения явления овершута путем снижения внеклеточной концентрации натрия, а следовательно, и E_{Na} (рис. 6.1). Они пришли к выводу, что потенциал действия есть результат значительного, хотя и кратковременного, увеличения натриевой проводимости мембраны. Сегодня известно, что это увеличение происходит за счет открытия огромного числа потенциалзависимых натриевых каналов.

Чем объясняется фаза спада потенциала действия? Можно предположить, что спад происходит просто в результате закрытия натриевых каналов. Это, действительно, один из факторов. Однако, если бы это был единственный механизм, то возврат мембранного потенциала к уровню потенциала покоя в большинстве клеток происходил бы гораздо

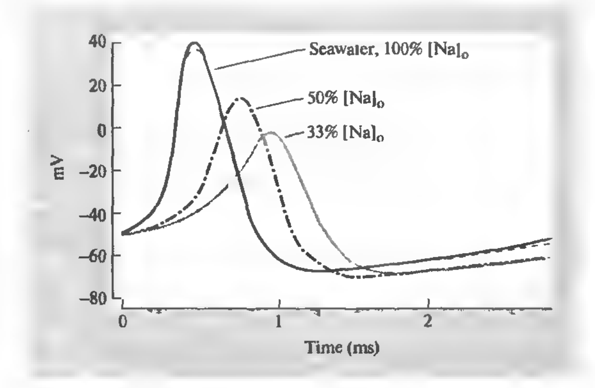


Рис. 6.1. Роль натрия в генерации потенциала действия. Потенциал действия, отведенный от аксона кальмара в морской воде (черный сплошной график), в растворах, содержащих 50 % (штрих-пунктир) и 33 % (серый) натрия от нормы, и затем снова в морской воде (пунктир).

Fig. 6.1. Role of Sodium in Action Potential Generation. Action potentials recorded from a squid axon bathed in seawater (black solid line), in solutions containing 50 % (dash-dot line) and 33 % normal sodium (grey), and then returned to seawater (dashed line). (After Hodgkin and Katz, 1949.)

медленнее, чем в действительности. Причина этого в том, что общая проводимость мембраны в покое достаточно мала, и выход накопленных в результате потенциала действия положительных ионов из клетки занял бы несколько миллисекунд, а то и десятки миллисекунд. В действительности, возврат к уровню потенциала покоя происходит гораздо быстрее благодаря значительному увеличению другой мембранной проводимости, а именно, за счет открытия калиевых каналов. С той же быстротой, с которой мембранный потенциал деполяризовался в направлении E_{Na}, он гиперполяризуется на фазе спада потенциала действия в направлении E_K. Увеличение калиевой проводимости может продолжаться до нескольких миллисекунд, что приводит во многих клетках не только к реполяризации, но и к гиперполяризации мембраны до значений более отрицательных, чем потенциал покоя (рис. 6.1).

Обобщим вышесказанное. Потенциал действия является результатом быстрого и значительного увеличения натриевой проводимости мембраны. Вход большого количества ионов хлора и аккумуляция положительного заряда на внутренней поверхности мембраны клетки сдвигает мембранный потенциал в направлении E_{Na}. Реполяризация мембраны происходит в результате последующего увеличения калиевой проводимости и уменьшения внутриклеточного положительного заряда из-за выхода ионов калия из клетки. Мембранный потенциал при этом вновь приближается к E_K. Такое объяснение механизма генерации потенциала действия ведет к пониманию принципов распространения импульса, рассматриваемых в главе 7.

Какое количество ионов входит в клетку и выходит из нее во время потенциала действия?

Если учесть, что на фазе роста потенциала действия в клетку входит большое количество натрия и большое количество калия ее покидает на фазе спада, то становится очевидным, что концентрации этих ионов в цитоплазме должны измениться. Величину этих изменений можно определить либо экспериментально, либо путем расчетов.

Вычисления соотношения между мембранным потенциалом и трансмембранных концентрационных градиентов приведены в главе 7. При потенциале −67 мВ на внутренней поверхности мембраны находится приблизительно $4 \cdot 10^{11}$ отрицательных зарядов на см^2. На пике потенциала действия (+40 мВ) вместо этого отрицательного заряда внутри клетки накапливается около $2{,}4 \cdot 10^{11}$ положительных зарядов, что происходит в результате входа в клетку $6{,}4 \cdot 10^{11}$ ионов натрия на см^2. Это соответствует приблизительно 10^{-12} моль/см^2. Экспериментальные измерения входа радиоактивного натрия и выхода радиоактивного калия[4)] дали значения между $3 \cdot 10^{-12}$ и $4 \cdot 10^{-12}$ моль/см^2. Различие между теоретически предсказанным и экспериментальным значениями объясняются главным образом тем, что при расчетах не принималось во внимание то, что вход натрия и выход калия частично перекрываются во времени. Таким образом, количество входящего натрия превышает значение, необходимое для деполяризации мембраны до пикового уровня потенциала действия, поскольку выход калия начинается до момента достижения пика.

Каково влияние входа натрия на его внутриклеточную концентрацию? Сегмент ак-

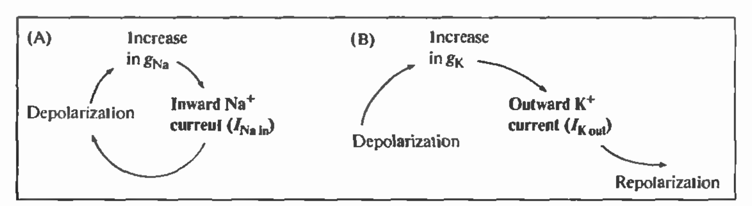


Рис. 6.2. Влияние повышения натриевой и калиевой проводимостей на мембранный потенциал. (А) Вход натрия усиливает деполяризацию. (В) Выход калия вызывает реполяризацию.

Fig. 6.2. Effects of Increasing Conductances (g_{Na} and g_K) on membrane potential. (A) Sodium entry reinforces depolarization. (B) Potassium efflux leads to repolarization.

сона кальмара длиной 1 см и диаметром 1 мм имеет площадь поверхности около 0,31 $см^2$, поэтому при скорости входа натрия $3{,}5 \cdot 10^{-12}$ приведет к накоплению приблизительно 10^{-12} М натрия. Объем этого отрезка аксона составляет $7{,}85 \cdot 10^{-12}$ л, в нем содержится (при плотности 50 ммоль/л) $4 \cdot 10^{-7}$ М натрия, поэтому изменение концентрации натрия в результате потенциала действия очень мало и составляет 0,0000025. Выход калия производит сравнимый эффект и изменяет внутриклеточную концентрацию калия в 0,000003 раз.

Потенциал действия в более тонких отростках нейрона может привести к более значительным изменениям внутриклеточных концентраций натрия и калия, чем в гигантском аксоне кальмара. Так, нервное окончание диаметром 1 мкм и длиной 100 мкм имеет площадь поверхности $3 \cdot 10^{-6}$ $см^2$ и объем $8 \cdot 10^{-14}$ л. Во время потенциала действия вход натрия $3 \cdot 10^{-6}$ моль/$см^2$ производит увеличение количества натрия внутри терминали на 10^{-17} М. При внутриклеточной концентрации 20 мМ в терминали содержится приблизительно $1{,}5 \cdot 10^{-15}$ М, так что увеличение концентрации натрия в результате одного потенциала действия составляет 0,7 %. Пачка из 50 импульсов теоретически приведет к увеличению уровня натрия на 35 % и сходному снижению уровня калия. Вход натрия увеличивает активность натрий-калиевого обменника (глава 4) так, что концентрации быстро возвращаются к изначальному уровню.

Положительная и отрицательная обратная связь во время изменений проводимости

Главным свойством натриевой и калиевой проводимостей, определяющим характер токов во время потенциала действия, является их потенциалзависимость: вероятность открытия ионных каналов увеличивается с деполяризацией мембранного потенциала. Деполяризация увеличивает натриевую проводимость, а также, с некоторой задержкой, калиевую. Воздействие деполяризации на натриевую проводимость носит **регенеративный** характер: сначала небольшая деполяризация увеличивает количество открытых каналов; ионы натрия, входящие в клетку по направлению своего электрохимического градиента, производят дальнейшую деполяризацию мембраны, открытие большего количества каналов, что влечет за собой вход еще большего числа ионов, и так далее (рис. 6.2А). Такой самоусиливающийся процесс характеризуется **положительной обратной связью**. Потенциалзависимость калиевых каналов, наоборот, характеризуется наличием **отрицательной обратной связи** (рис. 6.2В). При деполяризации количество открытых калиевых каналов возрастает, и ионы калия входят в клетку в направлении электрохимического градиента. Однако, вход калия не усиливает деполяризацию, а ведет к реполяризации и возвращению калиевой проводимости в состояние покоя.

Измерения проводимости

То, что до сих пор обсуждалось в этой главе, было предложено Ходжкином, Хаксли и Катцем[5] и детально разработано Ходжкином и Хаксли[6)–9], которые поставили элегантные опыты на гигантском аксоне кальмара. Они экспериментально показали, что при потенциале действия происходят изменения калиевой и натриевой проводимостей, и что последовательность этих изменений в точности определяет временной ход и величину потенциала действия.

На основании каких опытов был сделан этот вывод? На первый взгляд, измерение натриевой (g_{Na}) и калиевой (g_K) проводимостей кажется простой задачей. Нужно только измерить величину тока (I), протекающего через

мембрану при том или ином потенциале (V_m), поскольку:

$$g_{Na} = \frac{I_{Na}}{V_m - E_{Na}}, \quad g_K = \frac{I_K}{V_m - E_K}.$$

Однако, прежде необходимо решить две проблемы. Во-первых, ток, протекающий через мембрану, приведет к изменению мембранного потенциала; это, в свою очередь, вызовет изменение проводимостей. Решение было найдено путем разработки метода, позволяющего быстро устанавливать заданный мембранный потенциал и поддерживать его на постоянном уровне, при этом измеряя величину и временной ход мембранного тока. Поскольку потенциал фиксирован в течение всего времени эксперимента, ток будет аккуратно отражать изменения проводимости мембраны. Вторая проблема состоит в том, чтобы разделить различные компоненты мембранного тока для того, чтобы измерить их индивидуальные характеристики. Для преодоления этого затруднения применялись различные методы, в том числе замена натрия на ион, не проникающий через мембрану, а позднее использовались селективные токсины и яды.

§ 2. Эксперимент с фиксацией потенциала

Метод **фиксации потенциала** (voltage clamp) был разработан Колем[10, 11] и его коллегами, и усовершенствован Ходжкином, Хаксли и Катцем[6]. Все, что нам необходимо знать для того, чтобы понять сами эксперименты, это то, что метод позволяет практически мгновенно установить нужный уровень мембранного потенциала и зафиксировать его на этом уровне, измеряя при этом мембранный ток. На рис. 6.3A показан пример тока, протекающего через мембрану при скачкообразном изменении потенциала с уровня покоя (−65 мВ) на деполяризованный уровень (−9 мВ). Ток, возникающий в ответ на скачок потенциала, имеет три стадии: (1) короткий выброс выходящего тока, длящийся всего несколько миллисекунд, (2) ранний входящий ток и (3) поздний выходящий ток.

Емкость и ток утечки

Первоначальный кратковременный выброс тока представляет собой емкостной ток, обусловленный изменением заряда на мембране в результате изменения мембранного потенциала. Если усилитель обратной связи способен проводить большие токи, то емкостной ток длится очень недолго. На практике выброс емкостного тока длится около 20 мс, и за ним следует небольшой, но устойчивый выходящий ток.

Этот выходящий ток, протекающий через проводимости, активные при потенциале покоя, называется током утечки. Большей частью это ток ионов калия и хлора, который имеет линейную зависимость от величины смещения потенциала фиксации от потенциала покоя и наблюдается на всем протяжении скачка потенциала. Большую часть времени, однако, этот ток замаскирован другими, гораздо большими по величине ионными токами.

Токи ионов натрия и калия

Ходжкин и Хаксли показали, что вторая и третья стадии тока обусловлены сначала входом ионов натрия, а затем выходом ионов калия из клетки. Им также удалось выделить индивидуальные компоненты тока и рассчитать их величину и временной ход. Одним из удобных способов добиться этого послужило удаление из раствора большей части ионов натрия и замена их на ионы холина (которые не проходят через мембрану). Снизив содержание внеклеточного натрия, удалось добиться того, что натриевый равновесный потенциал сравнялся с деполяризованным мембранным потенциалом (−9 мВ на рис. 6.3A). Таким образом, суммарный ток натрия равнялся нулю. Остался только калиевый ток, который показан на рис. 6.3D. Натриевый ток (рис. 6.3C) был получен путем вычитания калиевого компонента из суммарного тока (рис. 6.3A).

Избирательные яды для натриевых и калиевых каналов

Со времен первоначальных опытов Ходжкина и Хаксли были найдены удобные фармакологические средства, позволяющие избирательно блокировать натриевые или калиевые токи. Особенно удобным средством блокирования натриевых токов оказался тетродотоксин (TTX) и его фармакологический спутник сакситоксин (STX) (глава 3). TTX представляет собой сильный яд, содержащийся в яичниках и других органах рыбы фугу. В своем обзоре Као[12] описывает захватывающую историю этого яда, начинающуюся с его

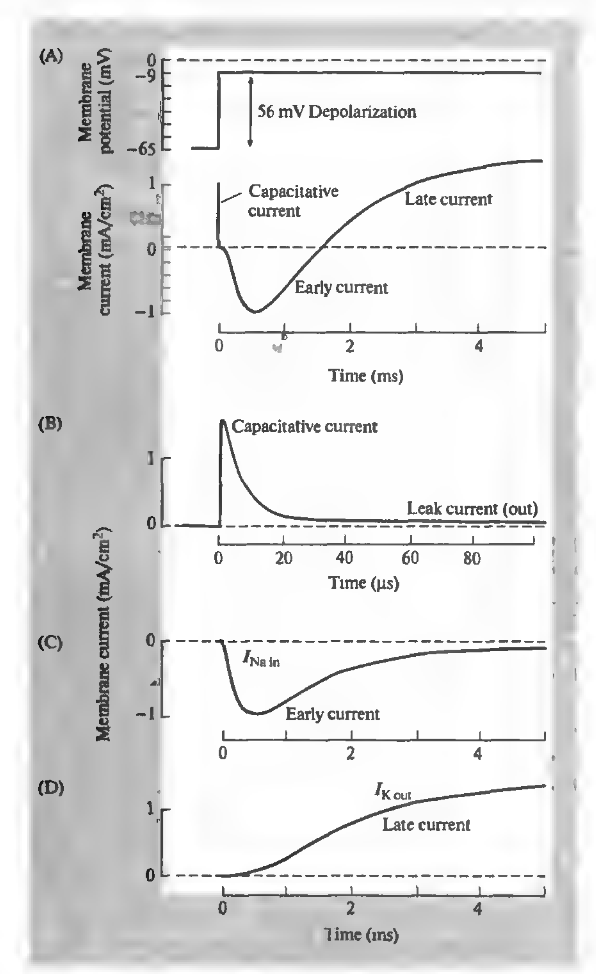


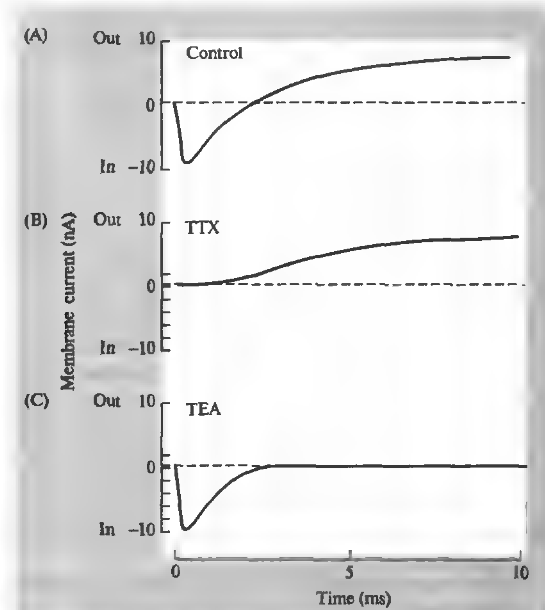
Рис. 6.3. Мембранные токи в ответ на деполяризацию. (A) Общий ток. (B) Емкостной ток. (C) Ранний входящий ток. (D) Поздний выходящий ток.

Fig. 6.3. Membrane Currents produced by depolarization. (A) Currents measured by a voltage clamp during a 56 mV depolarization of a squid axon membrane. The currents (lower trace) consist of a brief positive capacitative current, an early transient phase of inward current, and a late, maintained outward current. These are shown separately in B, C, and D. The capacitative current (B) lasts for only a few microseconds (note the change in timescale). The small outward leak current is due to the movement of potassium and chloride. The early inward current (C) is due to sodium entry, the late outward current (D) to potassium movement out of the fiber.

открытия китайским императором Шун Нунгом (2838–2698 до н. э). Император лично испробовал 365 различных веществ, составляя свою фармацевтическую коллекцию, и прожил на удивление долго. STX синтезируется морским планктоном и накапливается в питающихся планктоном моллюсках, таких как аляскинский *Saxidomus*. По силе действия этот яд сравним с ТТХ; употребление в пищу всего одного такого моллюска (сырым или в вареном виде) может привести к смертельному исходу.

Важное преимущество ТТХ для нейробиологических опытов заключается в высокой избирательности его действия. Мур, Нарахаши и их коллеги в своих экспериментах на аксоне кальмара показали, что ТТХ в концентрации всего 1 мкмоль или ниже избирательно блокирует потенциалзависимые натриевые каналы[13]. Изменение потенциала фиксации аксона, обработанного ТТХ, не приводит к возникновению входящего натриевого тока, но лишь выходящего калиевого (рис. 6.4A и B). Величина и временной ход калиевого тока не изменяются в присутствии ТТХ. Внутриклеточное введение ТТХ в аксон никак не действует на ток. Эффект STX ничем не отличается от эффекта ТТХ. Оба токсина связываются с одним и тем же посадочным местом, расположенным во внешнем устье канала, через которое проходят ионы натрия, и физически перекрывают им проход через мембрану[14].

Для калиевых каналов, участвующих в потенциале действия, также было найдено несколько блокирующих их веществ. Так, в ак-



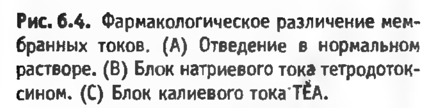


Рис. 6.4. Фармакологическое различение мембранных токов. (А) Отведение в нормальном растворе. (В) Блок натриевого тока тетродотоксином. (С) Блок калиевого тока ТЕА.

Fig. 6.4. Pharmacological Separation of Membrane Currents into sodium and potassium components. Membrane currents were produced by clamping of the membrane potential to 0 mV in a frog myelinated nerve. (A) Control record in normal bathing solution. (B) The addition of 300 n*M* tetrodotoxin (TTX) causes the sodium current to disappear while the potassium current remains. (C) The addition of tetraethylammonium (TEA) blocks the potassium current, leaving the sodium current intact. (After Hille, 1970.)

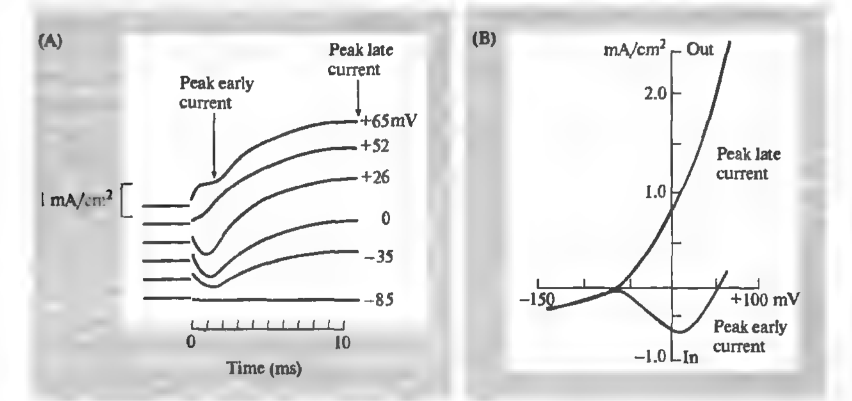


Рис. 6.5. Потенциалзависимость раннего и позднего токов. (А) Токи в ответ на гипер- и деполяризацию. (В) Зависимость амплитуды тока от величины пре-гиперполяризации и пре-деполяризации.

Fig. 6.5. Dependence of Early and Late Currents on Potential. (A) Currents produced by voltage steps from a holding potential of −65 mV to a hyperpolarized level (−85 mV) and to successively increasing depolarized levels as indicated. The late potassium current increases as the depolarizing steps increase. The early sodium current first increases, then decreases with increasing depolarization; it is absent at +52 mV and reversed in sign at +65 mV. (B) Peak currents plotted against the potential to which the membrane is stepped. Late outward current increases rapidly with depolarization. Early inward current first increases in magnitude, then decreases, reversing to outward current at about +55 mV (the sodium equilibrium potential). (After Hodgkin, Huxley, and Katz, 1952.)

соне кальмара и миелинизированном аксоне лягушки, как показали Армстронг, Хилле и их коллеги, тетраэтиламоний (ТЕА, в концентрациях выше 10 ммоль) блокирует потенциалзависимые калиевые каналы (см. рис. 6.4С)[15]. В аксоне кальмара ТЕА необходимо добавлять во внутриклеточный раствор, поскольку он блокирует внутреннее устье канала; в других препаратах, таких как перехват Ранвье лягушки, ТЕА эффективен и при внеклеточ-

ной аппликации. Другие соединения, такие как 4-аминопиридин (4-AP) или диаминопиридин (DAP), блокируют калиевые каналы в миллимолярных концентрациях как снаружи, так и изнутрн клетки.

Зависимость ионных токов от мембранного потенциала

Установив природу раннего и позднего компонента тока, Ходжкин и Хаксли исследовали зависимость натриевого и калиевого токов от мембранного потенциала. Токи, вызванные различными уровнями деполяризации от потенциала покоя −65 мВ, показаны на рис. 6.5A. Скачок потенциала на −85 мВ (нижняя кривая на рис. 6.5A) приводит лишь к возникновению небольшого входящего тока, как и следовало ожидать на основании свойств мембраны в состоянии покоя. Как уже было показано на рис. 6.3, каждый из небольших деполяризационных скачков производит сначала входящий ток, а затем более продолжительный выходящий. С увеличением величины деполяризационных скачков ранний ток уменьшается, при деполяризации на +52 мВ он равен нулю, а при еще более положительных значениях деполяризации меняет знак и становится выходящим.

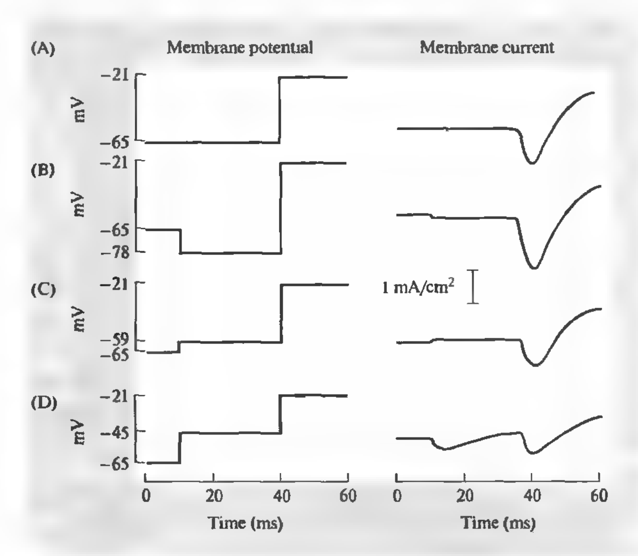
Потенциалзависимость ранней и поздней составляющих тока показана на рис. 6.5B. Максимальная амплитуда раннего тока и амплитуда уровня плато позднего тока расположены по оси ординат, а потенциал фиксации, который устанавливался скачком с уровня потенциала покоя — по оси абсцисс. При гиперполяризующих скачках нет разделения на ранние и поздние токи; мембрана отвечает на скачок потенциала как простой резистор. Поздний ток также ведет себя как резистор, поскольку деполяризация активирует выходящий ток, однако по мере увеличения уровня деполяризации величина тока начинает значительно превосходить величину, ожидаемую на основании свойств мембраны в покое. Это объясняется активацией потенциалзависимой калиевой проводимости, пропускающей дополнительный ток. Поведение раннего тока значительно более сложно. Как уже было отмечено, он сначала возрастает, а затем убывает по мере увеличения деполяризации, становится равным нулю при потенциале +53 мВ, а затем и вовсе меняет знак. Потенциал реверсии расположен близко к равновесному потенциалу для натрия, чего и следовало ожидать для тока ионов натрия.

Интересной особенностью потенциалзависимости раннего тока является то, что в диапазоне потенциалов от −50 до +10 мВ ток растет с ростом деполяризации. Величина натриевого тока зависит от натриевой проводимости (g_{Na}), а также от движущей силы для ионов натрия ($V_m - E_{Na}$). Можно было бы предположить, что благодаря этому ток будет *уменьшаться* по мере приближения мембранного потенциала к натриевому равновесному потенциалу, т. е. произойдет уменьшение движущей силы. Однако этого не происходит по причине резкого увеличения натриевой проводимости с возрастанием деполяризации (см. рис. 6.7), которое перевешивает эффект снижения движущей силы. Таким образом, натриевый ток $I_{Na} = g_{Na}(V_m - E_{Na})$ возрастает. Этот участок потенциалзависимости раннего тока называется «участком проводимости с отрицательным углом наклона».

Инактивация натриевого тока

Из опытов Ходжкина и Хаксли очевидно, что временной ход натриевого и калиевого токов весьма различен. Развитие калиевого тока замедлено по сравнению с натриевым, однако по достижении своего максимального уровня калиевый ток остается на нем довольно долго. Напротив, натриевый ток растет гораздо быстрее, но затем спадает до нуля, несмотря на то, что мембрана все еще деполяризована. Такой спад натриевого тока называется **инактивацией**.

Ходжкин и Хаксли детально изучили процесс инактивации натриевого тока. В частности, они исследовали влияние гиперполяризующих и деполяризующих пре-импульсов на пиковую амплитуду натриевого тока, возникающего в ответ на последующую деполяризацию. Пример такого эксперимента показан на рис. 6.6. На рис. 6.6A мембранный потенциал скачкообразно переведен с −65 на −21 мВ, в результате чего возникает натриевый ток величиной приблизительно 1 мА/см^2. Когда деполяризации предшествует гиперполяризация величиной −13 мВ, пиковое значение тока возрастает (рис. 6.6B). Деполяризующие пре-импульсы, напротив, снижают амплитуду натриевого тока (рис. 6.6C и D). Воздействие деполяризующих и гиперполяризующих пре-импульсов зависит от времени воздействия: короткие импульсы длиной в несколько миллисекунд неэффективны. В данном эксперименте длительность пре-



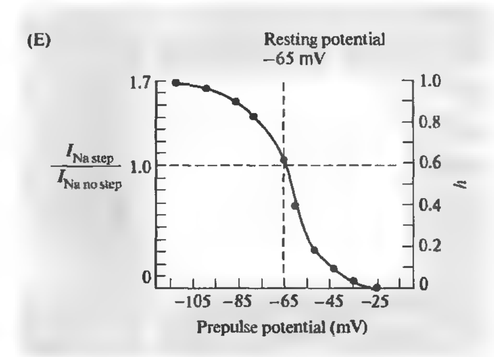


Рис. 6.6. Влияние мембранного потенциала на натриевый ток. (A) Ток в ответ на деполяризацию. (B) Увеличение амплитуды тока после пре-гиперполяризации. (C и D) Предварительная деполяризация снижает амплитуду входящего тока. (E) Зависимость относительного изменения амплитуды тока от пре-гиперполяризации и пре-деполяризации.

Fig. 6.6. Effect of Membrane Potential on Sodium Currents. (A) A depolarizing step from −65 to −21 mV produces inward sodium current, followed by outward potassium current. (B) When the depolarizing step is preceded by a 30 ms hyperpolarizing step, the sodium current is increased. Prior depolarizing steps (C and D) reduce the size of the inward current. (E) The fractional increase or reduction of the sodium current as a function of membrane potential during the preceding conditioning step. The maximum current with a hyperpolarizing step to −105 mV is about 1,7 times larger than the control value. A depolarizing step to −25 mV reduces the subsequent response to zero. Full range of the sodium current is scaled from zero to unity by the *h* ordinate.

импульсов была достаточной (30 мс) для достижения максимального эффекта.

Результаты представлены количественно на рис. 6.6E в виде зависимости пикового натриевого тока от потенциала пре-импульса. Пиковый ток выражен в долях амплитуды контрольного тока. При деполяризующем пре-импульсе порядка −30 мВ натриевый ток был снижен до нуля, т. е. инактивация была полной. Гиперполяризующие пре-импульсы до −95 мВ и ниже вызвали увеличение натриевого тока на 70 %. Ходжкин и Хаксли выразили этот диапазон значений натриевого тока от нуля до максимума одним параметром (h), принимающим значение от нуля (полная инактивация) до 1 (отсутствие инактивации), как показано на правой оси ординат на рис. 6.6E. В данных экспериментах инактивация при потенциале покоя была около 40 % максимального значения. Последующие эксперименты показали, что натриевые каналы всех нейронов демонстрируют ту или иную степень инактивации в покое.

Натриевая и калиевая проводимость как функция потенциала

Измерив таким образом величину и временной ход натриевого и калиевого токов как функции мембранного потенциала V_m и определив равновесные потенциалы E_{Na} и E_K, Ходжкин и Хаксли получили возможность рассчитать величину и временной ход изменений натриевой и калиевой проводимостей, используя приведенные ранее соотношения:

$$g_{Na} = \frac{I_{Na}}{V_m - E_{Na}}, \quad g_K = \frac{I_K}{V_m - E_K}.$$

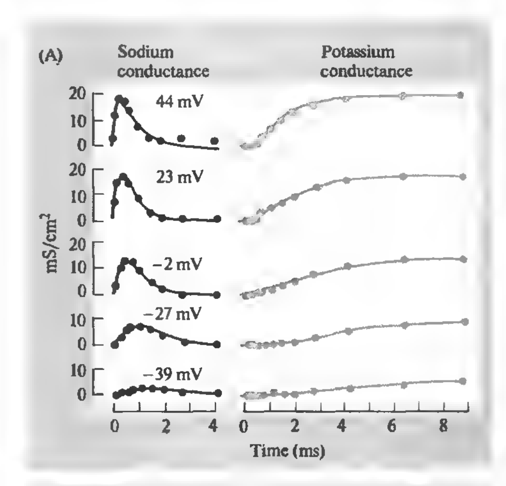
На рис. 6.7А показаны результаты пяти скачков потенциала. Как g_{Na}, так и g_K возрастают с увеличением деполяризации. Временной ход натриевой проводимости совпадает с натриевым током, однако ее потенциалзависимость существенно отличается от токовой (рис. 6.5). Проводимость равномерно нарастает с увеличением деполяризации, в то время как величина натриевого тока сначала возрастает, а затем убывает по мере увеличения деполяризационных скачков. Чем ближе мембранный потенциал во время деполяризации к натриевому равновесному потенциалу, тем меньше натриевый ток. В результате входящий ток уменьшается, несмотря на то, что проводимость растет. Зависимость максимальной проводимости для натрия и калия от мембранного потенциала показана на рис. 6.7В. Сходство кривых очевидно.

Обобщим вышесказанное. Результаты опытов Ходжкина и Хаксли показали, что деполяризация мембраны аксона вызывает три процесса: (1) активацию натриевой проводимости, (2) ее последующую инактивацию и (3) активацию калиевой проводимости.

Количественное описание натриевой и калиевой проводимостей

На основе полученных экспериментальных данных Ходжкин и Хаксли разработали математическую модель, способную точно описать временной ход изменений натриевой и калиевой проводимостей, происходящих в ответ на деполяризующий скачок потенциала. Если рассматривать калиевую проводимость, то логическим следствием изменения потенциала должно быть возникновение движущей силы, способной переместить один или несколько зарядов внутри потенциалзависимого калиевого канала, который в результате должен открыться. При условии, что речь идет об одном-единственном процессе, кинетика изменений калиевой проводимости должна описываться уравнением первого порядка, т. е. возрастание проводимости в ответ на деполяризацию должно быть экспоненциальным.

Вопреки таким рассуждениям, процесс увеличения калиевой проводимости начинается с задержкой и протекает по S-образной кривой (см. рис. 6.7А). Благодаря наличию этой задержки, а также тому, что увеличение калиевой проводимости возникает только в ответ на деполяризацию, но не гиперполяризацию, этот ионный канал получил название **задержанного выпрямления** (delayed rectifier). Ходжкин и Хаксли нашли способ для точного математического описания процесса увеличения калиевой проводимости, сделав допущение о том, что для для открытия канала необходима активация четырех процессов первого порядка (например, перемещение че-



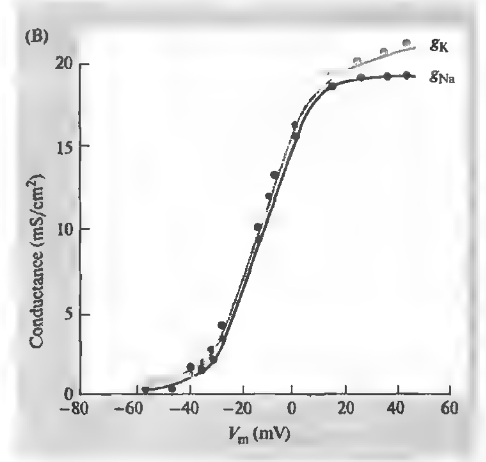


Рис. 6.7. Натриевая и калиевая проводимости. (А) Изменения проводимости в ответ на скачок потенциала. (В) Зависимость натриевой и калиевой проводимостей от потенциала во время скачка.

Fig. 6.7. Sodium and Potassium Conductances. (A) Conductance changes produced by voltage steps from −65 mV to the indicated potentials. Peak sodium conductance and steady-state potassium conductance both increase with increasing depolarization. (B) Peak sodium conductance and steady-state potassium conductance plotted against the potential to which the membrane is stepped. Both increase steeply with depolarization between −20 and +10 mV. (After Hodgkin and Huxley, 1952b.)

тырех заряженных частиц внутри мембраны). Другими словами, S-образную кривую можно описать суммой четырех экспонент. Таким образом, калиевую проводимость можно представить как

$$g_K = g_{K(max)}n^4,$$

где $g_{K(max)}$ — максимальная проводимость для данного скачка потенциала, а n — возрастающая экспоненциальная функция, принимающая значения от 0 до 1: $n = 1 - e^{-t/\tau_n}$.

Зависимость $g_{K(max)}$ от потенциала показана на рис. 6.7. Временная константа экспоненты, τ_n, также зависит от потенциала: чем больше деполяризация, тем быстрее возрастает проводимость. При температуре 10° С τ_n принимает значения в диапазоне от 4 мс для небольших деполяризаций до 1 мс для деполяризации до нуля мембранного потенциала.

Временной ход возрастания натриевой проводимости также имеет форму S-образной кривой, но описывается экспонентой, возведенной в третью степень. Напротив, спад натриевой проводимости в результате инактивации происходит по моноэкспоненциальной кривой. Для каждого конкретного скачка потенциала, общий временной ход изменений натриевой проводимости представляет собой результат наложения процессов активации и инактивации:

$$g_{Na} = g_{Na(max)}m^3h,$$

где $g_{Na(max)}$ — это максимальный уровень, которого натриевая проводимость достигла бы при отсутствии инактивации, а $m = 1 - e^{-t/\tau_m}$. Процесс инактивации представлен не нарастающей, а спадающей экспонентой, представленной как $h = e^{-t/\tau_h}$. Как и в случае калиевой проводимости, $g_{Na(max)}$ зависит от потенциала, также как и временные константы активации и инактивации. Временная константа активации натриевой проводимости τ_m гораздо короче калиевой, и при 10° С принимает значения от 0,6 мс (при значениях потенциала близких к потенциалу покоя) до 0,2 мс при нулевом мембранном потенциале. Временная константа инактивации τ_h близка по значению константе τ_n.

Реконструкция потенциала действия

Эмпирически полученные формулы, отражающие зависимость натриевой и калиевой проводимостей от потенциала и от времени, позволили Ходжкину и Хаксли предсказать временной ход всего потенциала действия и происходящих при этом изменений проводимостей. Начав с деполяризующего скачка потенциала, лишь немного превышающего пороговое значение, они рассчитали все последующие изменения мембранного потенциала с шагом 0,01 мс. Так, они подсчитали, как в течение первых 0,01 мс после деполяризации до −45 мВ изменятся g_{Na} и g_K, каково будет увеличение I_{Na} и I_K, и, наконец, каким будет в результате воздействие суммарного тока на V_m. Зная значение V_m в конце первого отрезка времени в 0,01 мс, они повторили те же вычисления для следующего промежутка, затем для следующего, и так далее, на протяжении всех фаз нарастания и спада потенциала действия (исключительно трудоемкая процедура, если учесть, что ни компьютеров, ни даже калькуляторов в те времена не было!).

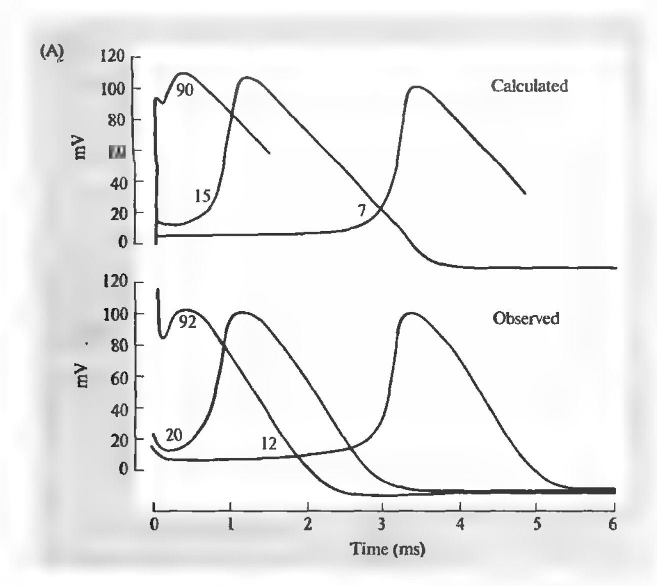
Результаты расчетов с удивительной точностью повторили форму реального потенциала действия аксона кальмара. На рис. 6.8А приведены экспериментально измеренный и рассчитанный потенциалы действия при трех различных уровнях деполяризации. Для того, чтобы по достоинству оценить значимость этих достижений, нужно иметь в виду, что параметры, использовавшиеся для расчетов, были получены в совершенно неестественных условиях, при которых потенциал последовательно фиксировался на разных уровнях.

Схема механизма генерации потенциала действия представлена на рис. 6.8В, где показаны величина и временной ход рассчитанного распространяющегося потенциала действия, а также расчетные изменения натриевой и калиевой проводимостей.

Порог и рефрактерный период

Ходжкин и Хаксли не только описали потенциал действия, но объяснили многие другие свойства возбудимых аксонов, например, **порог** и **рефрактерный период**. Со временем выяснилось, что описанные ими закономерности применимы и ко многим другим возбудимым тканям.

Можно ли на основе этих закономерностей предсказать величину порогового мембранного потенциала, при котором запускается механизм потенциала действия? Не означает ли дискретность такого понятия, как порог, того, что ионная проводимость тоже должна быть дискретной (не непрерывной) функцией? Для того, чтобы понять данный фено-



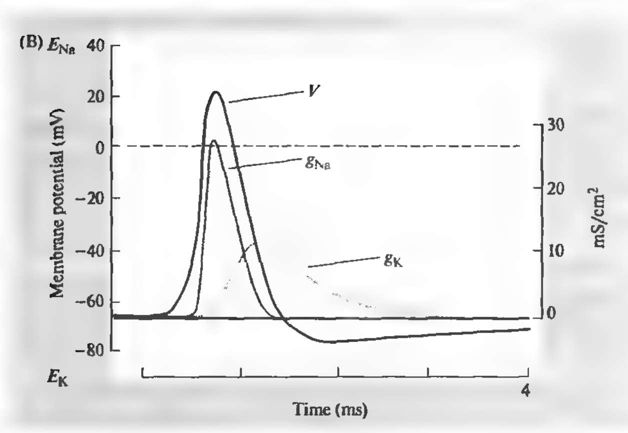


Рис. 6.8. Реконструкция потенциала действия. (A) Сравнение рассчитанного потенциала действия с реально измеренным. (B) Соотношение между потенциалом действия и изменениями натриевой и калиевой проводимостей.

Fig. 6.8. Reconstruction of the Action Potential. (A) Calculated action potentials produced by brief depolarizations of three different amplitudes (upper panel) are compared with those recorded under the same conditions (lower panel). (B) Relation between conductance changes (g_{Na} and g_K) and the action potential (V), calculated for a propagated action potential in a squid axon. (After Hodgkin and Huxley, 1952d.)

мен, представим себе ситуацию, при которой потенциал мембраны увеличивается вплоть до достижения порогового значения, а затем ток отключается. Поскольку мембрана деполяризована, выходящий ток будет превышать величину тока в покое, протекающего через калиевые каналы (и каналы утечки). Некоторое количество натриевых каналов также будет активировано, поэтому натриевый ток возрастет. При пороговом значении мембранного потенциала входящий и выходящий токи также уравновешивают друг друга, как и в состоянии покоя. Однако, есть одно важное отличие от покоя: равновесие это неустойчиво. Если в клетку войдет хотя бы один ион натрия, то возрастет деполяризация, возрастет и натриевая проводимость, в результате чего в клетку войдет еще большее количество натрия. Выходящий ток в такой ситуации уже не может компенсировать входа натрия,

поэтому возникает регенеративный процесс. С другой стороны, если теперь из клетки выйдет один ион калия, то деполяризация уменьшится, снизится и натриевая проводимость, в результате чего избыточный выходящий ток приведет к гиперполяризации. По достижении уровня потенциала покоя калиевый ток снизится до величины противоположного ему натриевого тока. Если потенциал выше порогового, то увеличение натриевой проводимости достаточно для того, чтобы натриевый ток значительно превзошел калиевый и реполяризации не возникло. Если, напротив, потенциал мембраны ниже уровня порога, то увеличение g_{Na} не будет достаточно большим, и калиевый ток приведет к гиперполяризации.

Каков механизм возникновения рефрактерного периода? Во время потенциала действия происходят два процесса, в результате которых нейрон не способен какое-то время генерировать следующий потенциал действия. Во-первых, инактивация натриевых каналов достигает наибольшего уровня во время фазы спада потенциала действия, и на ее устранение необходимо несколько миллисекунд. Во-вторых, благодаря активации калиевых каналов, g_K очень высока на спаде потенциала действия, и постепенно возвращается к уровню покоя. В этих условиях для возбуждения каких-либо деполяризующих регенеративных процессов потребовалось бы очень большое увеличение g_{Na}. Два вышеприведенных фактора приводят мембрану в состояние **абсолютной рефрактерности**, которое поддерживается в течение фазы спада потенциала действия и характерно тем, что никакая деполяризация мембраны не способна запустить следующий регенеративный процесс. После абсолютной рефрактерности наступает **период относительной рефрактерности**, в ходе которого порог постепенно снижается к своему нормальному значению, натриевые каналы восстанавливаются из инактивированного состояния, а калиевые каналы закрываются.

Достижения Ходжкина и Хаксли в детальном объяснении столь сложных биофизических процессов трудно переоценить. Даже несмотря на то, что более поздние эксперименты по регистрации одиночных каналов дополнили наши знания о молекулярных механизмах мембранных процессов, без ранних опытов с фиксацией потенциала и их интерпретации невозможно было бы определить, каким образом происходит генерация и проведение потенциала действия на основе одних лишь данных об одиночных каналах. Все последующие исследования лишь обогатили, но ни в коем случае не упразднили данных, полученных первопроходцами.

Токи воротного механизма

Ходжкин и Хаксли высказали предположение, что активация натриевого канала связана с перемещением внутри мембраны заряженных структур, или частиц. Они предположили, что подобное перемещение вносит вклад в емкостной ток, производимый деполяризационным скачком. После того как были разрешены некоторые технические проблемы, эти токи воротного механизма удалось, наконец, увидеть[16, 17].

Как отличить воротный ток от обычного емкостного тока, возникающего в результате скачкообразного изменения потенциала (см., например, рис. 6.3)? Токи, обусловленные исключительно процессами зарядки и разрядки мембраны, должны быть симметричными. Другими словами, их величина должна быть одинакова как для деполяризующих, так и для гиперполяризующих скачков потенциала. Напротив, токи, связанные с натриевыми каналами, должны возникать в ответ на деполяризацию (к примеру, от −70 мВ до −20 мВ), но не в ответ на гиперполяризацию с того же начального потенциала. Иными словами, если канал уже закрыт, то в ответ на дальнейшую гиперполяризацию ток не возникнет. Сходным образом воротные токи, связанные с закрытием канала, должны протекать в момент окончания деполяризующего, но не гиперполяризующего скачка потенциала. Таким образом, один из возможных способов записи воротного тока состоит в сложении токов, производимых скачками потенциала одинаковой величины и противоположной полярности. Асимметрия, связанная с наличием воротных токов, проиллюстрирована на рис. 6.9А, части a и b. Ток, протекающий в начале деполяризующего скачка, больше тока, вызванного гиперполяризацией, благодаря дополнительному перемещению заряда в связи с работой воротного механизма натриевого канала. При сложении двух токов (рис. 6.9А, c) получается воротный ток (или «ток асимметрии») в чистом виде.

На рис. 6.9B показан пример воротного тока в аксоне кальмара, полученный способом взаимного вычитания емкостного тока. Потенциалзависимые калиевые токи были заблокированы при помощи TEA. Скачкообраз-

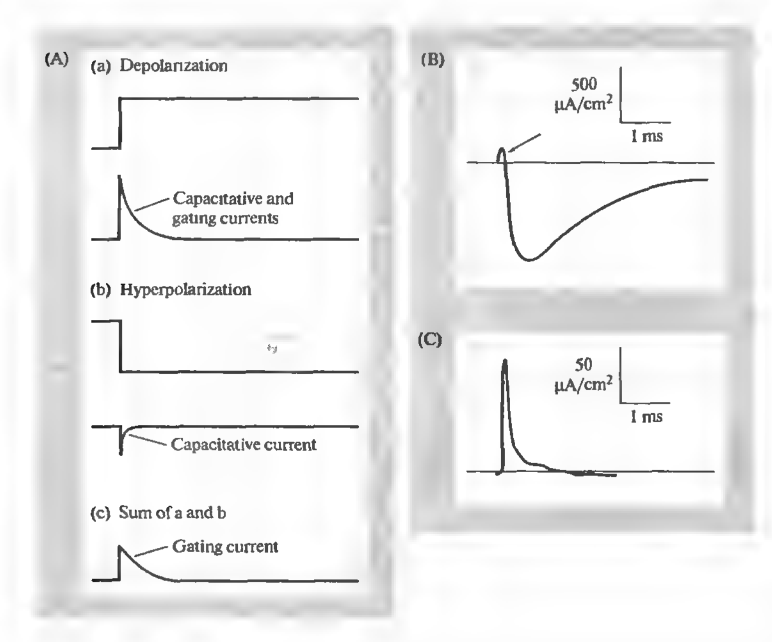


Рис. 6.9. Воротный ток натриевого канала. (A) Принцип разделения воротного и емкостного токов. (B) Пример воротного тока с последующим натриевым. (C) Изолированный воротный ток в присутствии TTX.

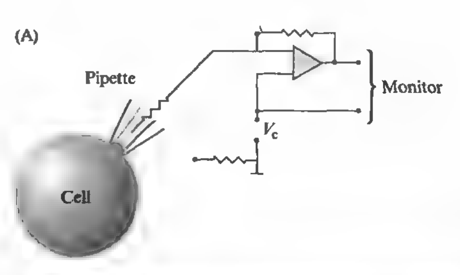
Fig. 6.9. Sodium Channel Gating Current. (A) Method of separating gating current from capacitative current. A depolarizing pulse (a) produces capacitative current in the membrane, plus gating current. A hyperpolarizing pulse of the same amplitude (b) produces capacitative current only. When the responses to a hyperpolarizing and a depolarizing pulse are summed (c), capacitative currents cancel out and only gating current remains. (B) Record of current from a squid axon in response to a depolarizing pulse, after cancellation of capacitative current. Inward sodium current was reduced by lowering extracellular sodium to 20 % of normal. The small outward current (arrow) preceding the inward current is the sodium channel gating current. (C) Response to depolarization from the same preparation after adding TTX to the bathing solution, recorded at higher amplification. Only the gating current remains. (B and C after Armstrong and Bezanilla, 1977.)

ная деполяризация перфузированного аксона кальмара вызвала сначала воротный ток, а вслед за ним входящий ток натрия. Натриевый ток в данном случае гораздо меньше обычного, поскольку внеклеточная концентрация натрия снижена до 20 % от нормы. На рис. 6.9C показан воротный ток в чистом виде, зарегистрированный после того, как натриевый ток был полностью устранен с помощью тетродотоксина (обратите внимание на изменение вертикальной шкалы). Данные о том, что ток асимметрии действительно связан с активацией натриевых каналов, собраны в обзоре Армстронга[18].

Активация и инактивация одиночных каналов

Использование метода patch-clamp позволило получить подробную информацию о том, как натриевые каналы отвечают на деполяризацию. Один из экспериментов с использованием этого метода приведен на рис. 6.10. Ток регистрировался от мышечного волокна крысы в культуре, в режиме cell-attached[19]. Для устранения инактивации натриевых каналов мембрана была гиперполяризована на некоторое время до −100 мВ. Затем через пэтч-электрод была приложена деполяризация величиной 40 мВ приблизительно на 20 мс (рис. 6.10B, a). Приблизительно в 30 % случаев активации натриевых каналов в ответ на деполяризацию не было. В остальных случаях одиночные каналы открывались один или два раза, и наиболее часто это происходило в самом начале деполяризации (рис. 6.10B, b). Средний ток составил 1,6 пА. Если допустить, что натриевый равновесный потенциал равен +30 мВ, то потенциал, создающий движущую силу для натрия, составит приблизительно −90 мВ; следовательно, проводимость одиночного канала равна 18 пСм. Эта величина сравнима с проводимостью натриевых каналов, измеренной в различных типах клеток. Просуммировав 300 отдельных токов одиночных каналов (рис. 6.10B, c), получим входящий ток, временной ход которого совпадает с током, протекающим в мембране целой клетки.

Как видно из рис. 6.10, среднее время пребывания канала в открытом состоянии (0,7 мс) невелико в сравнении с временным



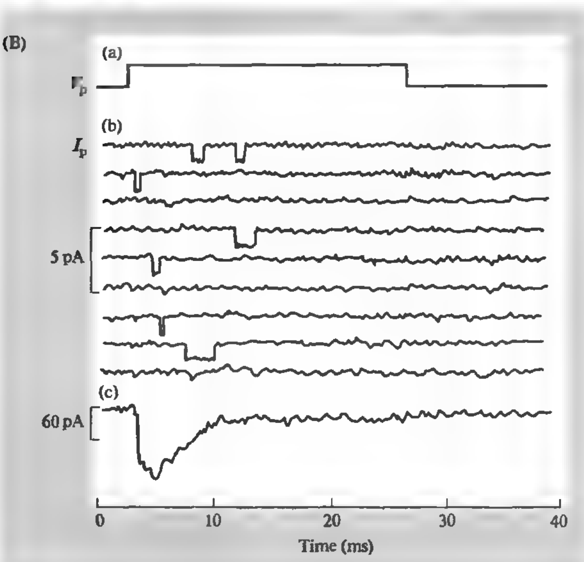


Рис. 6.10. Токи натриевых каналов. (A) Схема опыта. (B) Токи одиночных каналов в ответ на повторные деполяризующие скачки потенциала.

Fig. 6.10. Sodium Channel Currents recorded from cell-attached patch on a cultured rat muscle cell. (A) Recording arrangement. V_c = the command potential applied to the membrane patch. (B) Repeated depolarizing voltage pulses applied to the patch, with the waveform shown in (a), produce single-channel currents (downward deflections) in the nine successive records shown in (b). The sum of 300 such records (c) shows that channels open most often in the initial 1 to 2 ms after the onset of the pulse, after which the probability of channel opening declines with the time constant of inactivation. (After Sigworth and Neher, 1980.)

ходом суммарного тока. Константа времени спада последнего (около 4 мс) не отражает то время, в течение которого отдельные каналы открыты. Время спада суммарного тока связано временем снижения вероятности открытия канала. Процессы активации (m^3) и инактивации (h) отражают сначала увеличение, а затем снижение *вероятности* того, что канал откроется в данный момент на короткое время. Произведение этих двух величин (m^3h) описывает временной ход обобщенного изменения вероятности, которая быстро возрастает в начале деполяризации, достигает максимального значения, а затем постепенно спадает. При каждом отдельном деполяризующем скачке канал может открыться в самом начале, в середине или в конце деполяризации, или вовсе не открыться.

Обратимся вновь к рис. 6.9. Из рисунка видно, что перемещение заряда практически заканчивается в течение 0,5 мс, до того, как натриевый ток достигнет максимального значения, т. е. до того, как большинство каналов перешло в открытое состояние. Отсюда следует, что изменение конформации белковой молекулы канала, связанное с перемещением зарядов внутри мембраны, отлично от изменения конформации, связанного с открытием канала. Неверно было бы, следовательно, говорить об этих зарядах как о некоей «ручке», непосредственно открывающей ворота канала. Перемещение зарядов означает лишь то, что вероятность перехода канала в открытое (или инактивированное) состояние возросла.

§ 3. Молекулярные механизмы активации и инактивации

Воротные механизмы потенциалзависимых каналов

Данные исследований структуры потенциалзависимых каналов указывают на то, что воротный механизм расположен недалеко от цитоплазматической части поры (глава 2). Один

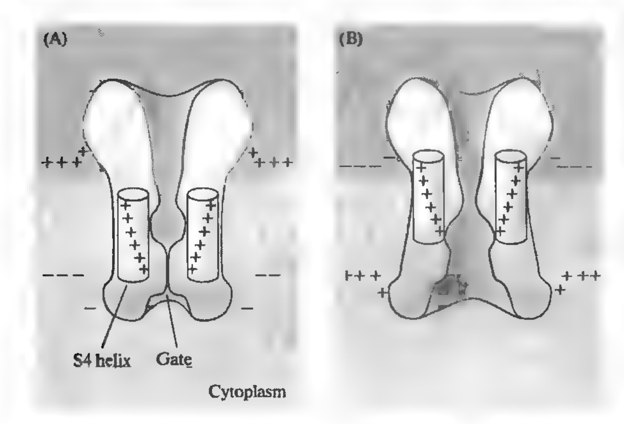


Рис. 6.11. Предполагаемое смещение спирали S4 деполяризацией мембраны. (A) Состояние покоя. (B) Деполяризованное состояние, вызывающее открытие канала.

Fig. 6.11. Proposed Shift of S4 Helices by membrane depolarization. Charged S4 helices are represented in two of the four domains of a voltage-activated sodium channel. (A) At the resting potential the helices are held against the inner end of the channel and the channel-gating elements are closed. (B) Depolarization causes outward movement of the positively charged helices, allowing the gate to open.

из открытых вопросов заключается в том, как именно ворота канала зависят от мембранного потенциала. Для того, чтобы потенциалзависимый воротный механизм функционировал, необходимо наличие заряженных элементов в составе белка канала, которые меняют свое положение при деполяризации. Именно такое перемещение заряда отвечает за возникновение воротного тока. Одной из структур, привлекших особое внимание исследователей в этой связи, является спираль S4, пронизывающая мембрану и содержащая цепочку положительно заряженных аминокислот, а именно, лизина или аргинина, расположенных на каждой третьей позиции на данном участке молекулы (рис. 6.11). Это общее свойство всех членов супер-семейства потенциалзависимых каналов навело ученых на мысль о том, что спираль S4 играет роль потенциалчувствительного элемента, обеспечивающего связь между мембранным потенциалом и работой воротного механизма[20]. Таким образом, деполяризация мембраны (т. е. увеличение положительного заряда внутри клетки) должна вызвать смещение положительных зарядов в направлении внеклеточной среды, поэтому вся спираль переместится в том же направлении (рис. 6.11B), а вероятность открытия канала увеличится. Механизм увеличения вероятности еще не изучен полностью.

Для проверки этой гипотезы были произведены направленные мутации гена, кодирующего область S4 молекулы натриевого канала мозга крысы[21]. Нейтральные или кислые аминокислотные остатки заменили на один или более щелочных остатков, с тем чтобы исследовать их влияние на активацию канала. Гипотеза состояла в том, что если удалить положительные заряды из спирали, то для активации канала потребуется более высокий уровень деполяризации мембраны. Данное предположение подтвердилось, когда мутации затрагивали участки молекулы поблизости от ее цитоплазматического окончания. Подобные результаты были получены в результате экспериментов с мутациями S4 калиевых каналов типа A[22].

Биохимические эксперименты на каналах-мутантах также подтвердили, что активация канала сопровождается изменениями в сегменте S4[23, 24]. В этих экспериментах аминокислотные остатки по обеим концам спирали были заменены на цистеин. Затем исследовали доступность сульфгидрильных групп цистеина для гидрофильных реагентов (глава 3). Аминокислоты, которые были недоступны с внеклеточной стороны мембраны в состоянии покоя, во время деполяризации становились доступными. В то же время те остатки, которые были доступны изнутри, становились недоступными во время деполяризации, что указывало на перемещение спирали в сторону внеклеточной поверхности мембраны.

Обобщим вышесказанное. Несмотря на недостаточность экспериментальных данных, можно с высокой степенью надежности допустить, что перемещение спирали S4 в направлении наружной поверхности мембраны представляет собой первый этап воротного механизма. В состоянии покоя отрицательный внутриклеточный заряд притягивает спираль в направлении цитоплазмы. В момент деполяризации снижение величины отрицательного заряда позволяет спирали переместиться в противоположном направлении. Перемещение S4 влечет за собой дополнительные изменения конформации белковой молекулы, которые в конце концов приводят к открытию канала.

Инактивация натриевого канала

Из экспериментов Ходжкина и Хаксли с пре-деполяризацией и пре-гиперполяризацией мембраны следует, что инактивация представляет собой самостоятельный процесс, отделимый от активации. Последующие эксперименты с использованием проназы подтвердили эти гипотезу. После перфузии внутриаксонной среды раствором проназы (смеси протеолитических ферментов) процесс инактивации замедлился, а затем полностью исчез[25)]. Внеклеточное приложение ферментов в той же концентрации не имело эффекта. Очевидно, проназа разрушила часть цитоплазматического окончания белка, отвечающую за инактивацию канала. На основании этих данных Армстронг и Безанилла разработали модель «шара на цепочке», по которой внутриклеточная блокируюшая частица (шар), закрепленная на цитоплазматическом окончании белковой молекулы канала посредством гибкого соединения (цепочки), при своем раскачивании способна блокировать канал во время инактивации[26)].

В результате экспериментов на натриевых каналах удалось идентифицировать внутриклеточную петлю, состоящую из аминокислотных остатков, которая участвует в процессе инактивации. В петле содержится приблизительно 45 остатков, и она подобна булавке, которая, раскачиваясь из стороны в сторону, входит во внутриклеточное устье канала и тем самым блокирует его. В исследовании на каналах мозга крысы, экспрессированных в ооцитах, были выделены три аминокислотных остатка, расположенные в средней части петли, которые необходимы для инактивации[27, 28)]. Удаление или замена этих остатков методом направленного мутагенеза приводит к ослаблению или устранению инактивации. Подобного рода эксперименты помогли также выявить группы пролиновых и глициновых остатков на обоих концах петли, участвующей в инактивации. Их принято считать местами «подвески», позволяющей булавке попасть в устье канала[29)].

Кроме того, активация и инактивация натриевых каналов зависят от группы гидрофобных токсинов, включающей в себя вератридин, алкалоид из растений семейства лилий, и батрахотоксин, получаемый из кожи южноамериканской лягушки. Эти токсины полностью устраняют инактивацию, так что каналы остаются открытыми сколь угодно долго[30)].

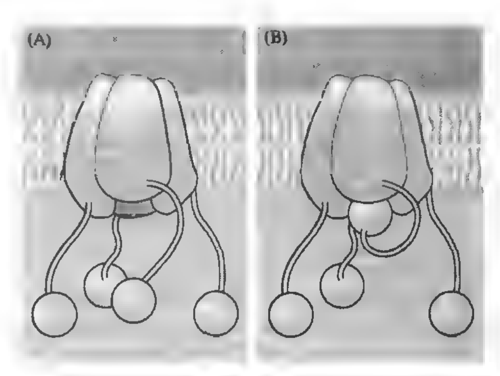


Рис. 6.12. Модель инактивации потенциалзависимого калиевого канала «шар на цепочке». (А) Воротный механизм на внутренней стороне рецептора в открытом состоянии. (В) Один из четырех инактивационных «шаров» блокирует устье канала.

Fig. 6.12. Ball-and-Chain Model of Inactivation of a voltage-activated potassium channel. The figure shows the complete channel, with one ball-and-chain element tethered to each of the four channel subunits. (A) Gating elements at the inner (cytoplasmic) end of the channel are open. (B) One of the four inactivation balls enters the inner vestibule to block the open channel.

Кроме того, они смещают потенциалзависимость активации каналов таким образом, что они открываются при потенциале покоя.

Инактивация калиевого канала типа А

Внутриклеточная структура, связанная с инактивацией, была впервые идентифицирована для калиевых каналов А–типа дрозофилы (глава 3), которые, в отличие от натриевых каналов, инактивируются во время деполяризации. Экспериментально показано, что инактивация зависит от цепочки внутриклеточных аминокислот и происходит по схеме «шара на цепочке», предложенной ранее для натриевых каналов. Модель проиллюстрирована на рис. 6.12. Шар соответствует сгустку аминокислот, а цепочка — последовательности аминокислотных остатков, связывающих шар с основной структурой канала в целом. Во время деполяризации шар связывается с посадочным местом в устье канала, тем самым блокируя его.

Для экспериментальной проверки данной модели исследовали поведение каналов, экспрессированных в ооцитах генами, кодирующими субъединицы-мутанты (напомним, что А–канал представляет собой тетрамер, а не одиночный полипептид). Около 80 аминокислот на участке между N-концом

и первой мембранной спиралью S1 были удалены или мутированы[31]. Канал, состоящий из субъединиц с устраненными аминокислотами (с 6 по 46), практически не демонстрировал инактивации, что указывает на участие некоторых из этих аминокислот в процессе инактивации. При добавлении в раствор, омывающий цитоплазматическое окончание канала, синтетического пептида, содержащего первые 20 аминокислот N-терминали в соответствующей последовательности, инактивация была восстановлена и обладала линейной концентрационной зависимостью в диапазоне от 0 до 100 мкМ[32]. Эти замечательные наблюдения убедительно показали, что первые 20 аминокислот калиевого А–канала ответственны за блокирующее действие в процессе инактивации. Этот тип инактивации калиевых каналов зачастую называют N-типом, благодаря участию в нем N-терминали. Некоторые типы калиевых каналов обладают также свойством С-инактивации, более медленной, получившей свое название из-за первоначального предположения об участии в ней С–терминали. Впоследствии, однако, было показано, что С–инактивация связана со структурами, расположенными недалеко от внешнего устья поры канала[33, 34].

Кинетические модели активации и инактивации каналов

Обнаружив, что временной ход активации натриевых и калиевых каналов лучше всего описывается экспонентами, возведенными в третью или четвертую степень (m^3 и n^4), Ходжкин и Хаксли предположили, что активация и инактивация объясняется независимым перемещением трех или четырех заряженных частиц внутри мембраны. Например, можно предположить, что для открытия канала необходимо, чтобы деполяризация вызвала смещение спиралей S4 во всех четырех субъединицах, составляющих калиевый канал. Можно также предположить, что смещение по крайней мере трех подобных структур необходимо для активации натриевого канала. Далее, можно допустить, что как минимум одно подобное смещение связано с инактивацией. Подобная параллельная модель была предложена Кейнесом[35, 36].

Предположение о том, что в процессе активации канала задействовано четыре отдельных события (таких, как смещение S4), дает возможность говорить о 16 различных состояниях канала: без смещения (одно состояние), одно из четырех возможных смещений (четыре состояния), два из четырех (шесть состояний), три из четырех (четыре состояния) и все четыре смещения (одно состояние). Если все переходы между состояниями независимы и кинетически идентичны, то количество возможных состояний сокращается до пяти: без смещения, смещение в одной области, смещение в двух, в трех и в четырех областях. Таким образом, переход из закрытого в открытое состояние будет выглядеть следующим образом:

$$C_4 \longleftrightarrow C_3 \longleftrightarrow C_2 \longleftrightarrow C_1 \longleftrightarrow O,$$

где C_4 — состояние канала в покое, C_3 и т. д. — серия закрытых состояний при деполяризации, а O — открытое состояние. Для натриевых каналов необходимо добавить состояние инактивации. Исследования как одиночных каналов, так и токов от целой клетки показали, что инактивация натриевых каналов не зависит от того, побывали ли каналы предварительно в открытом состоянии[37, 38]. Переход в состояние инактивации (I), таким образом, может произойти как из открытого, так и из закрытого состояния:

$$C_4 \longleftrightarrow C_3 \longleftrightarrow C_2 \longleftrightarrow C_1 \longleftrightarrow O.$$
$$\searrow\ \swarrow$$
$$I$$

Разными авторами были предложены многочисленные модификации данной схемы, включающие большее или меньшее количество переходов, а также несколько инактивированных состояний[39, 40]. Отличие этих схем от модели Ходжкина и Хаксли состоит в том, что процессы активации и инактивации проходят через несколько общих состояний, а не протекают параллельно и независимо, как показано выше. Кроме того, хотя переходы из одного состояния канала в другое и должны быть потенциалзависимы, это вовсе не обязательно для окончательных переходов в активированное или инактивированное состояния[41, 42].

Сколько в действительности различных состояний канала? Достоверно это не известно, хотя есть основания полагать, что в процессе активации натриевого канала происходит как минимум три отдельных перемещения заряда. Конти и Штумер[43] пришли к такому выводу на основе опытов по измерению воротных токов в больших участках мембраны в конфигурации cell-attached

(так называемые «макро-пэтчи»). Каналы были экспрессированы в ооцитах *Xenopus* путем инъекции РНК натриевых каналов, полученной из мозга крысы. Величину единицы заряда, переносимого воротным током, рассчитали на основе средних значений для большого количества индивидуальных воротных токов. Метод напоминает расчет величины тока одиночных каналов путем измерения шума (глава 2): соотношение среднего и вариации (разброса) пропорционально амплитуды одиночных событий. Подсчитанная величина элементарного заряда, переносимого воротным током, составила 2,3 заряда электрона (2,3*e*). Полный заряд, переносимый одним каналом, можно оценить на основе угла наклона кривой активации (см. рис. 6.7В): чем больше заряд исследуемой структуры, тем меньше величина изменения потенциала, требующаяся для изменения конформации этой структуры. На основе этого соображения было подсчитано, что при активации происходит перенос заряда величиной от 6*e* до 8*e*, т. е. в три раза превышающего элементарный заряд, переносимый воротным током. Примечательно соответствие данных результатов первоначальной модели активации, предложенной Ходжкиным и Хаксли. Конти и Штумер отметили, что наиболее привлекательной интерпретацией их результатов будет предположение о том, что перенос заряда связан с тремя из четырех субъединиц, в то время как инактивация связана с взаимодействием между ними и четвертой субъединицей. Разумеется, данные исследования не принимают во внимание возможные переходы в промежуточные состояния, поскольку последние никак не проявляются электрически.

Обобщим вышесказанное. Кинетические модели указывают на то, что в результате деполяризации запускается цепочка последовательных конформационных изменений, ведущих, в конечном итоге, к открытию канала. Точное описание этих изменений не представляется возможным, однако в наиболее общем виде их можно себе представить (глава 3). Были сделаны первые шаги в определении того, с какими группами аминокислот в молекулах натриевого и калиевого каналов связана их инактивация. По мере того, как совершенствуется наше понимание молекулярной анатомии этих каналов, несомненно, будут установлены новые структурно-функциональные связи.

Свойства канала, связанные с потенциалом действия

В ходе экспериментов методом пэтч-кламп на крысиных мышечных волокнах в культуре, проводимость потенциалзависимых натриевых каналов была измерена непосредственно и составила 20 пСм (рис. 6.10); подобные измерения в мотонейронах крысы выявили проводимость величиной 14 пСм[44]. Плотность натриевых каналов была измерена в ряде тканей методом исследования плотности мест связывания ТТХ. Используя меченый тритием тетродотоксин, Левинсон и Мевес[45] определили, что на один квадратный микрометр мембраны аксона кальмара приходится приблизительно 553 места связывания молекулы токсина. Цифры, полученные в других тканях, варьируют от 2 молекул на мкм^2 в оптическом нерве новорожденных крысят[46] до 2 000 в перехвате Ранвье седалищного нерва кролика[46]. Плотность натриевых каналов в скелетной мышце была измерена методом локальной деполяризации небольшого участка мембраны с помощью внеклеточной пипетки при одновременном измерении натриевого тока, протекающего через этот участок мембраны. Результаты варьировали от одного участка к другому, что указывает на неравномерность распределения каналов в мембране. Плотность была наибольшей в районе концевой пластинки, снижалась по мере удаления от нее и достигала 10 % от максимального уровня по мере приближения к сухожилию[48]. Кроме того, было показано, что натриевые каналы в мышце группируются в кластеры[49].

Проводимость калиевых каналов, ответственных за позднюю составляющую тока, была измерена в препарате вскрытого аксона кальмара[50]. Каналы типа «выпрямитель с задержкой» обладают проводимостью 10, 20 и 40 пСм, причем наиболее часто встречается канал с проводимостью 20 пСм. Подобно натриевым, калиевые каналы мышцы лягушки распределены не равномерно, а кластерами[36]. Тем не менее, паттерны расположения кластеров натриевых и калиевых каналов не совпадают между собой. Выпрямители с задержкой полностью отсутствуют в перехватах Ранвье миелинизированного нерва кролика, так как в ответ на деполяризацию поздний выходящий ток не возникает[51]. В ходе потенциала действия реполяризация после быстрой инактивации натриевых каналов достигается за счет большого тока утечки.

Вклад открытых калиевых каналов в реполяризацию

Кроме выпрямителя с задержкой, в нейронах имеется целый ряд других типов калиевых каналов[52], некоторые из которых принимают участие в реполяризации мембраны. Один из таких каналов — это **А-канал**, быстро активируемый в результате деполяризации. Вклад А-каналов в реполяризацию в ходе потенциала действия минимален по двум причинам: они быстро инактивируются, и в большинстве клеток активация этого типа каналов возможна лишь при условии предварительной гиперполяризации (т. е. они инактивированы в состоянии покоя). Два других типа потенциалзависимых калиевых каналов, **М-канал** (глава 16) и **S-канал**, похожи на выпрямитель с задержкой тем, что открываются в ответ на деполяризацию. Дополнительное свойство М-каналов состоит в том, что они инактивируются ацетилхолином через *мускариновые* АХ рецепторы (отсюда название). S-каналы открыты в покое и инактивируются *серотонином*.

Кальций-активируемые калиевые каналы также могут вносить вклад в реполяризацию[53]. В ходе потенциала действия кальций входит в клетку через потенциалзависимые кальциевые каналы (см. следующий раздел). Во многих типах клеток такое повышение уровня кальция способствует увеличению калиевой проводимости, которая способствует реполяризации и приводит к последуюшей гиперполяризации. Существует как минимум три подтипа кальций-активируемых калиевых каналов, с очень большим (200 пСм), средним (30 пСм) и малым (10 пСм) уровнями проводимости. Наличие этих каналов можно продемонстрировать экспериментально посредством повышения уровня кальция внутри клетки, например, путем инъекции через внутриклеточную микропипетку[54]. Вслед за такой инъекцией проводимость мембраны резко возрастает и мембранный потенциал покоя приближается к калиевому равновесному потенциалу. По мере устранения излишков кальция из цитоплазмы за счет внутриклеточных буферов и выброса кальция из клетки, сопротивление и потенциал возвращаются к своему нормальному уровню. Существует также тип калиевых каналов, активируемый внутриклеточным натрием[55, 56]. В некоторых клетках активация таких каналов может вносить вклад в реполяризацию в ходе потенциала действия[57].

§ 4. Роль кальция в возбуждении клетки

Кальциевые потенциалы действия

В мембране нервов и мышечных волокон содержится большое количество потенциалзависимых кальциевых каналов (см. главу 3, классификация и свойства кальциевых каналов). Кальций, входящий в клетку через эти каналы во время потенциала действия, оказывает влияние на самые разные процессы (главы 9–12). К примеру, кратковременное увеличение уровня кальция в ходе потенциала действия вызывает секрецию как секрецию химических медиаторов в нервном окончании, так и сокращение мышечного волокна.

В некоторых мышечных волокнах и нейронах кальциевые токи достигают такой величины, что либо вносят значительный вклад, либо полностью формируют фазу роста потенциала действия. Процесс этот носит регенеративный характер благодаря возрастанию g_{Ca} при деполяризации, точно такому, как у натриевых каналов (см. выше). Участие кальциевых каналов в потенциале действия было впервые изучено Фаттом и Гинзборгом[58], а впоследствии Хагиварой[59]. Кальциевые потенциалы действия описаны в сердечной мышце, в целом ряде нейронов беспозвоночных, а также в нейронах вегетативной и центральной нервной системы позвоночных[60]. Наличие кальциевых потенциалов действия также показано в не-нейрональных типах клеток, таких как ряд эндокринных клеток и некоторых яйцеклетках беспозвоночных. Потенциалзависимые кальциевые токи блокируются в миллимолярных концентрациях кобальтом, магнием или кадмием, добавленным во внеклеточный раствор. Барий может заменить кальций в прохождении через пору канала; магний на это не способен. Поразительным примером со-существования натриевых и кальциевых потенциалов действия в одном типе клеток является клетка Пуркинье в мозжечке млекопитающих. Натриевые потенциалы действия генерируются в теле клетки Пуркинье, в то время как кальциевые — в дендритах[61, 62].

Ионы кальция и возбудимость

Ионы кальция влияют также на возбудимость мембраны: снижение внеклеточной концентрации кальция приводит к увеличению возбудимости; повышение внеклеточного уровня кальция, напротив, влечет за собой снижение

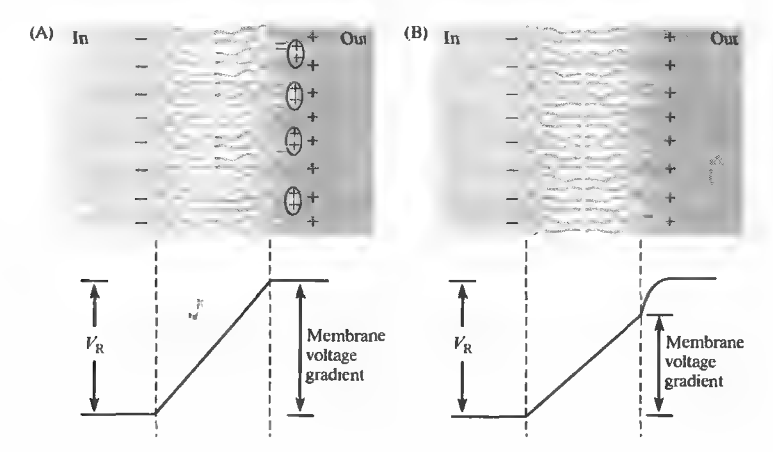


Рис. 6.13. Влияние поверхностного заряда на мембранный потенциал. (A) Нейтрализация двухвалентными катионами отрицательных зарядов в структуре мембраны. (B) Устранение экранирующих элементов (например, кальция) изменяет распределение заряда и градиент потенциалов на мембране, но не потенциал покоя.

Fig. 6.13. Effect of Surface Charge on Membrane Potential, proposed to explain the effects of calcium on action potential threshold. (A) The membrane structure includes negatively charged elements on the outer surface whose charge is neutralized by divalent cations. The resting membrane potential, VR, produced by ionic charge separation, is determined by the composition of the intracellular and extracellular fluids. (B) When the fixed negative surface charges are unscreened (e. g., by removing calcium from the extracellular solution) the resting potential is unchanged, but the shape of the potential profile is altered by the surface negativity, reducing the potential gradient across the membrane.

возбудимости. Франкенхаузер и Ходжкин[63] использовали метод фиксации потенциала для исследования этих эффектов в аксоне кальмара. Они обнаружили, что при снижении внеклеточной концентрации кальция происходит сдвиг потенциалзависимости активации натриевых каналов таким образом, что для достижения порога и генерации натриевого тока нормальной величины требовались меньшие уровни деполяризации. Снижение уровня необходимой деполяризации было постоянным во всем диапазоне возбудимости и зависело от концентрации кальция. Пятикратное повышение внеклеточного уровня кальция приводило к снижению порогового уровня деполяризации на 10–15 мВ.

Франкенхаузер и Ходжкин предположили, что этот эффект может быть обусловлен тем, что ионы кальция частично заслоняют (или экранируют) отрицательные заряды, расположенные на внешней поверхности мембраны. Подобное воздействие на мембрану может оказать, к примеру, гликолизация мембранных белков последовательностями углеводов, содержащими отрицательно заряженную сиаловую кислоту. Натриевый канал ската сам по себе обладает более чем 100 остатками сиаловой кислоты[64]. При условии заслонения зарядов градиент потенциала на мембране будет равен измеряемому потенциалу покоя (рис. 6.13А). После устранения кальция, заряды, лишенные экранирования, увеличат отрицательный заряд на внешней стороне мембраны, тем самым снижая общий электрический градиент (рис. 6.13В). Эта гипотеза вносит новый ракурс в понимание мембранного потенциала: разность потенциалов между внутри- и внеклеточным растворами определяется вне- и внутриклеточной концентрациями ионов, а также проводимостями, как показано в главе 5. Однако, форма градиента потенциала может зависеть от заряженных молекул, связанных с поверхностью мембраны. Для потенциалчувствительных элементов мембраны этот эффект будет иметь огромное значение, поскольку они распознают лишь те градиенты потенциала, которые находятся в непосредственной близости от них.

Одна из проблем с гипотезой поверхностного заряда состоит в том, что удаление внеклеточного кальция должно повлиять не только на активацию, но и на инактивацию натриевых каналов, а также на активацию калиевых. Снижение порога натриевой инактивации и калиевой активации приведет тогда к *снижению* возбудимости. В силу неизвестных при-

чин, влияние устранения кальция на эти параметры гораздо менее выражено, чем влияние на активацию натриевых каналов[64, 65]. Возможно, это и не удивительно, что локальные изменения электрического градиента оказывают столь разное влияние на различные молекулы канала, или даже на разные участки одной и той же молекулы, в зависимости от расположения потенциалчувствительного элемента относительно поверхностных зарядов. Какими бы ни были причины этих различий, общий эффект кальция заключается в стабилизации мембраны и внесении дополнительной степени надежности при варьировании уровня потенциала мембраны между покоем и порогом для потенциала действия.

Выводы

- Потенциал действия в большинстве клеток возникает за счет кратковременного возрастания натриевой проводимости, которое стремится привести мембранный потенциал к уровню натриевого равновесного потенциала и за которым следует увеличение калиевой проводимости, возвращающее мембрану в состояние покоя.
- Возрастание проводимостей возникает благодаря потенциалзависимости натриевых и калиевых каналов: вероятность их открытия возрастает при деполяризации.
- Эксперименты на аксоне кальмара с фиксацией потенциала предоставили детальную информацию о потенциалзависимости и временном ходе изменений проводимостей. При деполяризации мембраны натриевая проводимость сначала быстро активируется, а затем инактивируется. Калиевая проводимость активируется с задержкой и остается на высоком уровне до тех пор, пока не кончится деполяризация.
- Временной ход и потенциалзависимость изменений натриевых и калиевых проводимостей в точности определяют амплитуду и временной ход потенциала действия, а также такие характеристики мембраны, как порог активации и рефрактерный период.
- Теоретически активация натриевой и калиевой проводимостей при деполяризации должна быть связана со смещением заряда внутри клетки. Эти смещения, называемые воротными токами, удалось измерить экспериментально.
- Эксперименты с использованием метода пэтч-кламп дополнили сведения, полученные в более ранних опытах с фиксацией потенциала, новыми деталями о процессе возбуждения. Так, например, натриевые каналы открываются на довольно короткое время, и вероятность их открытия в ходе деполяризации сначала возрастает, а затем снижается, в соответствии с активацией и инактивацией натриевой проводимости в целой клетке. Различные кинетические модели были предложены с целью описания процессов активации и инактивации каналов.
- Кальций играет важную роль в возбуждении. В некоторых клетках именно вход кальция, а не натрия, отвечает за фазу роста потенциала действия. Кроме того, внеклеточный уровень кальция определяет возбудимость мембраны. Снижение внеклеточной концентрации кальция приводит к увеличению возбудимости.

Рекомендуемая литература

- Armstrong, C. M., and Hille, B. 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20: 371–380.
- Frankenhaeuser, B., and Hodgkin, A. L. 1957. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol.* 137: 218–244.
- Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, Chapters 2–5.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., and Katz, B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116: 424–448.
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1952. Currents carried by sodium and potassium ion through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116: 449–472.
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1952. The components of the membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116: 473–496.
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1952. The dual effect of membrane potential on sodium conduc-

tance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116: 497–506.

- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500–544.

Цитированная литература

1. Overton, E. 1902. *Pflügers Arch.* 92: 346–386.
2. Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1939. *Nature* 144: 710–711.
3. Hodgkin, A. L., and Katz, B. 1949. *J. Physiol.* 108: 37–77.
4. Keynes, R. D., and Lewis, P. R. 1951. *J. Physiol.* 114: 151–182.
5. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., and Katz, B. 1952. *J. Physiol.* 116: 424–448.
6. Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1952. *J. Physiol.* 116: 449–472.
7. Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1952. *J. Physiol.* 116: 473–496.
8. Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1952. *J. Physiol.* 116: 497–506.
9. Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. 1952. *J. Physiol.* 117: 500–544.
10. Marmont, G. 1940. *J. Cell. Comp. Physiol.* 34: 351–382.
11. Cole, K. S. 1968. *Membranes, Ions and Impulses.* University of California Press, Berkeley.
12. Kao, C. T. 1966. *Pharmacol. Rev.* 18: 977–1049.
13. Narahashi, T., Moore, J. W., and Scott, W. R. 1964. *J. Gen. Physiol.* 47: 965–974.
14. Hille, B. 1970. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 21: 1–32.
15. Armstrong, C. M., and Hille, B. 1972. *J. Gen. Physiol.* 59: 388–400.
16. Armstrong, C. M., and Bezanilla, F. 1974. *J. Gen. Physiol.* 63: 533–552.
17. Keynes, R. D., and Rojas, E. 1974. *J. Physiol.* 239: 393–434.
18. Armstrong, C. M. 1981. *Physiol. Rev.* 61: 644–683.
19. Sigworth, F. J., and Neher, E. 1980. *Nature* 287: 447–449.
20. Sigworth, F. J. 1994. *Q. Rev. Biophys.* 27: 1–40.
21. Stühmer, W., et al. 1989. *Nature* 239: 597–603.
22. Papazian, D. M., et al. 1991. *Nature* 349: 305–349.
23. Yang, N., George, A. L., and Horn, R. 1996. *Neuron* 16: 113–122.
24. Larsson, H. P., et al. 1996. *Neuron* 16: 387–397.
25. Armstrong, C. M., Bezanilla, F., and Rojas, E. 1973. *J. Gen. Physiol.* 62: 375–391.
26. Armstrong, C. M., and Bezanilla, F. 1977. *J. Gen. Physiol.* 70: 567–590.
27. West, J. W., et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10910–10914.
28. Kallenberger, S., et al. 1997. *J. Gen. Physiol.* 109: 589–605.
29. Kallenberger, S., et al. 1997. *J. Gen. Physiol.* 109: 607–617.
30. Catterall, W. A. 1980. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 15–43.
31. Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. 1990. *Science* 250: 533–550.
32. Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. 1990. *Science* 250: 568–571.
33. Hoshi, T. W., Zagotta, N., and Aldrich, R. W. 1991. *Neuron* 7: 547–556.
34. Choi, K. L., Aldrich, R. W., and Yellen, G. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5092–5095.
35. Keynes, R. D. 1990. *Proc. R. Soc. Lond. B* 240: 425–432.
36. Keynes, R. D., and Elinder, F. 1998. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 263–270.
37. Bean, B. P. 1981. *Biophys. J.* 35: 595–614.
38. Aldrich, R. W., and Stevens, C. F. 1983. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 48: 147–153.
39. Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, Chapter 18.
40. Patlach, J. 1991. *Physiol. Rev.* 71: 1047–1080.
41. Aldrich, R. W., and Stevens, C. F. 1987. *J. Neurosci.* 7: 418–431.
42. Cota, G., and Armstrong, C. M. 1989. *J. Gen. Physiol.* 94: 213–232.
43. Conti, F., and Stühmer, W. 1989. *Eur. Biophys. J.* 17: 53–59.
44. Safronov, V. B., and Vogel, W. 1995. *J. Physiol.* 487: 91–106.
45. Levinson, S. R., and Meves, H. 1975. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 270: 349–352.
46. Waxman, S. G., et al. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1406–1410.
47. Ritchie, J. M. 1986. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 479: 385–401.
48. Beam, K. G., Caldwell, J. H., and Campbell, D. T. 1985. *Nature* 313: 588–590.
49. Almers, W., Stanfield, P., and Stühmer, W. 1983. *J. Physiol.* 336: 261–284.
50. Lanno, I., Webb, C. K., and Bezanilla, F. 1988. *J. Gen. Physiol.* 92: 179–196.
51. Chiu, S. Y., et al. 1979. *J. Physiol.* 292: 149–166.
52. Mathie, A., Wooltorton, J. R., and Watkins, C. S. 1998. *Gen. Pharmacol.* 30: 13–44.

53. Vergara, C., et al. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 321–329.
54. Meech, R. W. 1974. *J. Physiol.* 237: 259–277.
55. Partridge, L. D., and Thomas, R. C. 1976. *J. Physiol.* 254: 551–563.
56. Martin, A. R., and Dryer, S. E. 1989. *Q. J. Exp. Physiol.* 74: 1033–1041.
57. Koh, D-S., Jonas, P., and Vogel, W. 1994. *J. Physiol.* 479 (Pt. 2): 183–197.
58. Fatt, P., and Ginsborg, B. L. 1958. *J. Physiol.* 142: 516–543.
59. Hagiwara, S., and Byerly, L. 1981. *Annu. Rev. Neurosci.* 4: 69–125.
60. Hagiwara, S. 1983. *Membrane Potential-Dependent Ion Channels in Cell Membrane. Phylogenetic and Developmental Approaches.* Raven, New York.
61. Llinàs, R., and Sugimori, M. 1980. *J. Physiol.* 305: 197–213.
62. Ross, W. N., Lasser-Ross, N., and Werman, R. 1990. *Proc. R. Soc. Lond. B* 240: 173–185.
63. Frankenhaeuser, B., and Hodgkin, A. L. 1957. *J. Physiol.* 137: 218–244.
64. Miller, J. A., Agnew, W. S., and Levinson, S. R. 1983. *Biochemistry* 22: 462–470.
65. Hille, B. 1968. *J. Gen. Physiol.* 51: 221–236.

Глава 7

Нейроны как проводники электричества

Потенциал действия продвигается вдоль аксона за счет продольного распространения тока. Каждый участок мембраны, генерируя импульс по принципу «все или ничего», своей деполяризацией возбуждает соседний участок. Для понимания механизма распространения импульса, а также синаптической передачи и интеграции, необходимо уяснить принцип пассивного распространения импульсов вдоль нерва.

По мере своего продвижения вдоль аксона или дендрита ток теряет свою силу. Снижение величины тока зависит от ряда причин, в первую очередь от диаметра и свойств мембраны нервного волокна. Продольное распространение тока тем больше, чем больше диаметр волокна и чем выше сопротивление мембраны. Емкостные свойства мембраны влияют на временной ход электрических сигналов, а также на распространение тока. Чтобы оценить, на какое расстояние способен распространиться подпороговый потенциал, необходимо знать геометрию и свойства мембраны нейрона и, кроме того, временной ход изменения потенциала.

Аксоны многих типов нервных клеток у позвоночных покрыты оболочкой из миелина, обладающего высоким сопротивлением и малой емкостью. Миелиновая оболочка играет роль изоляционной обмотки провода и заставляет ток перемещаться вдоль мембраны. При этом ток быстро перескакивает от одного перехвата Ранвье (короткого участка мембраны, лишенного миелина) до другого, и скорость проведения при этом возрастает. Миелинизированные волокна встречаются в тех областях нейронной сети, где скорость проведения играет важную роль.

Электрические сигналы способны также передаваться с одного нейрона на другой в местах тесного контакта между ними, называемых щелевыми контактами. Ток в таких соединениях протекает по особым каналам, коннексонам.

§ 1. Пассивные электрические свойства нервных и мышечных мембран

Особенности проницаемости нейрональных мембран и то, как они способствуют генерации потенциала действия, обсуждались в предыдущих главах. В данной главе речь пойдет главным образом о том, как токи распространяются вдоль нервного волокна и образуют локальные разности потенциалов.

Пассивные электрические свойства нейронов, а именно, сопротивление и емкость мембраны, а также сопротивление цитоплазмы, играют важнейшую роль в нейрональной сигнализации. В органах чувств эти свойства являются связующим звеном между сенсорным стимулом и генерацией импульса; на уровне аксона они позволяют импульсу распространиться; на уровне синапсов они определяют способность постсинаптического нейрона складывать и вычитать синаптические потенциалы, возникающие на многочисленных синаптических входах, будь то вблизи тела клетки или на самых отдаленных дендритах. Для понимания этих процессов нужно знать принципы распространения электрических сигналов вдоль нейронных отростков. В данной главе речь пойдет главным образом о нервных волокнах с постоянным диаметром на всем своем протяжении, т. е. о цилиндрических проводниках. Кроме того, для данного описания мы примем, что в отсутствие регенерации мембрана действительно пассивна, т. е. изменения потенциала, не достигающие порогового уровня, не активируют потенциалзависимых проводимостей и не изменяют тем самым сопротивления мембраны. Данные принципы применимы и к более сложным структурам, таким как разветвления аксонных окончаний или дендритные ветвления с неоднородными электрическими свойствами[1, 2]. Роль подобных структур в функционировании нервной системы весьма велика, однако количественное описание их электричес-

ких свойств потребовало бы более сложного анализа.

Кабельные свойства нервных и мышечных волокон

Цилиндрическое нервное волокно состоит из тех же компонентов, что и подводный электрический кабель: из стержневого проводника и изоляционной оболочки, окруженной проводящей средой. Тем не менее, количественное отличие этих двух систем весьма велико. Стержень кабеля обычно сделан из меди или металла с очень высокой проводимостью, в то время как оболочка сделана из пластика или других материалов с очень высоким сопротивлением. Кроме того, оболочка обычно бывает довольно толстая и потому обладает низкой емкостью (приложение А). Напряжение, приложенное к такому проводу, способно передаться на значительное расстояние благодаря тому, что сопротивление меди мало, как незначительны и потери через оболочку. Содержимое нервного волокна представляет собой раствор солей, по концентрации похожий на внеклеточную среду и, в отличие от меди, обладающий плохой проводимостью. Мембрана клетки, в свою очередь, не является хорошим изолятором и обладает высокой емкостью ввиду своей малой толщины. Напряжение, приложенное к нервному волокну, не распространяется на значительное расстояние по двум причинам: 1) проводимость содержимого волокна мала, следовательно, сопротивление току велико; 2) ток, протекающий вдоль цитоплазмы, рассеивается благодаря утечке сквозь мембрану, не обеспечивающую достаточной изоляции.

Анализ тока в кабеле был начат лордом Кельвином применительно к трансатлантической телефонной связи и усовершенствован Оливером Хевисайдом. В конце XX в. Хевисайд впервые учел значимость утечки тока через изоляционную оболочку, эквивалентную клеточной мембране, а также внес множество важных дополнений в кабельную теорию, в том числе определил понятие импеданса. Кабельная теория была впервые использована для нервных волокон Ходжкиным и Раштоном[3)], которые экспериментально измерили распространение потенциала действия в аксоне омара с помощью внеклеточных электродов. Позднее для подобных измерений в целом ряде нервных и мышечных волокон использовались внутриклеточные электроды.

В данном разделе рассматривается зависимость продольного распространения тока от сопротивления мембраны и аксоплазмы. Основным правилом здесь является закон Ома: ток i, проходя через сопротивление r, создает напряжение $v = ir$ (приложение А). Ниже в этой главе мы рассмотрим также влияние мембранной емкости на величину и временной ход продольного распространения тока.

Ток в кабеле

Для лучшего понимания принципов прохождения тока по кабелю представим себе, как распространяется тепло вдоль металлического прута в теплоизолирующей оболочке, который помещен в проводящую среду (например, в воду). Если нагревать прут с одного конца, тепло распространяется вдоль прута и, по мере своего распространения, частично рассеивается в окружающую среду, проникая через оболочку. Чем дальше от нагреваемого конца, тем ниже температура; по мере снижения температуры снижается и скорость рассеяния тепла. При условии, что окружающая среда обладает высокой теплопроводностью, расстояние, на которое распространится теплота, будет зависеть главным образом от двух параметров: 1) от теплопроводности прута и 2) от изолирующих свойств оболочки.

Протекание тока в кабеле происходит похожим образом. Напряжение, приложенное к одному концу кабеля, вызывает протекание тока по стержню в продольном направлении, который частично теряется сквозь оболочку в окружающую среду. Чем дальше от конца, к которому приложено напряжение, тем меньше ток. Расстояние, на которое распространится ток, будет зависеть от проводимости стержня и от того, насколько эффективно оболочка предотвращает потери тока. Оболочка с низким сопротивлением пропустит весь ток в окружающую среду. Оболочка с более высоким сопротивлением позволит току распространиться на большее расстояние.

Ток в аксоне переносится ионами: при инъекции тока в нервное волокно (например, в аксон омара) через микроэлектрод, как показано на рис. 7.1А, инъецированные положительные заряды будут отталкивать другие катионы и притягивать анионы. Самый распространенный из небольших ионов внутри клетки — это калий, который, следовательно, переносит наибольшее количество тока через мембрану. Ток протекает в продольном

направлении вдоль аксона, и по мере продвижения часть его теряется благодаря перемещению ионов через мембрану. В мембране с низким сопротивлением и большой ионной проводимостью большая часть тока потеряется до того, как он успеет переместиться на сколь-нибудь значительное расстояние. При более высоком сопротивлении мембраны ток распространится вдоль аксона на большее расстояние, прежде чем рассеяться в окружающую среду.

Входное сопротивление и постоянная длины

На рис. 7.1А представлен ток, протекающий через различные участки мембраны вдоль аксона на разном расстоянии от отводящего электрода. Толщина каждой стрелки приблизительно соответствует величине тока в каждом отдельно взятом участке. По закону Ома падение напряжения на данном расстоянии от электрода пропорционально мембранному току на том же расстоянии. Возникает два вопроса:

1) Каково будет изменение напряжения на электроде при данном количестве тока, проходящем через электрод?
2) Как далеко это изменение напряжения распространится вдоль волокна?

Чтобы ответить на эти вопросы, достаточно измерить изменение напряжения с помощью еще одного электрода, вставляемого в волокно на различном расстоянии от первого электрода, как показано на рис. 7.1А. Результаты подобных измерений показаны на рис. 7.1В. Изменение напряжения имеет наибольшее значение в месте инъекции тока и постепенно снижается по мере удаления от него.

Спад величины изменения напряжения носит экспоненциальный характер, так что потенциал (V_x) при данном значении расстояния x равен:

$$V_x = V_0 e^{-x/\lambda}.$$

Максимальный потенциал V_0 пропорционален величине инъецируемого тока. Коэффициент пропорциональности называется **входным сопротивлением** волокна, r_{input}. Он равен среднему сопротивлению, встречаемому ионным током, протекающим через аксоплазму и мембрану во внеклеточную среду. Таким образом, если величина инъецированного тока равна i, то

$$V_0 = i r_{\text{input}}.$$

Постоянная длины волокна λ — это расстояние, на котором потенциал снижается в e раз (до 37% от начального значения). Эти два параметра, r_{input} и λ, определяют величину изменения потенциала в ответ на инъекцию тока, а также расстояние, на которое это изменение распространится вдоль волокна.

Сопротивление мембраны и продольное сопротивление

Кабель можно представить себе в виде цепочки элементов сопротивления, r_m и r_i, соединенных последовательно (рис. 7.1С). Такая цепочка получится, если вообразить себе аксон разрезанным на цилиндрические сегменты. Сопротивление мембраны r_m соответствует сопротивлению стенки цилиндра; продольное сопротивление r_i составляет внутреннее сопротивление вдоль участка аксоплазмы между серединой данного цилиндра и серединой следующего. Поскольку нерв обычно помещают в большое количество жидкости, то *внеклеточное* продольное сопротивление можно принять за ноль. Это допущение не всегда верно для центральной нервной системы, в которой аксоны и дендриты нейронов, а также глиальные клетки (см. главу 8) упакованы настолько плотно, что протекание внеклеточного тока ограничено. В случае рассматриваемого опыта такое допущение справедливо и служит для максимального упрощения математических выражений. Длина цилиндрических сегментов может быть любой, однако r_m и r_i принято указывать из расчета на участок аксона длиной 1 см. Сопротивление мембраны r_m выражается в омах, умноженных на сантиметр (Ом · см). Величина может показаться странной, но она объясняется тем, что сопротивление *убывает* с увеличением длины волокна, а значит, с увеличением количества каналов, через которые теряется ток. Таким образом, сопротивление данного участка мембраны аксона в омах равняется сопротивлению сантиметрового участка (r_m в Ом · см), деленному на длину данного участка (в см). Постоянная r_i выражается, как и следовало ожидать, в омах, деленных на сантиметр (Ом/см).

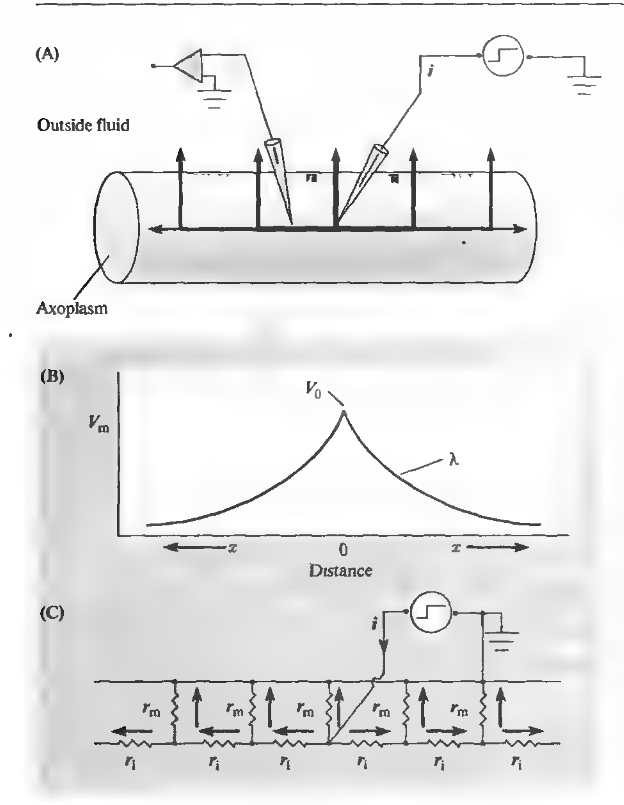


Рис. 7.1. Токи в мембране аксона. (А) Ток (i), протекающий в мембране, в ответ на инъекцию постоянного тока через микроэлектрод. (В) Потенциал (V_m) как функция расстояния (x) от места инъекции тока. (С) Эквивалентная электрическая схема, в которой сопротивление внеклеточной среды принято за ноль, а емкость мембраны не учитывается.

Fig. 7.1. Pathways for Current Flow in an axon. (A) Current flow (i) across the membrane produced by a steady injection of current from a microelectrode. Thickness of the arrows indicates current density at various distances from the point of injection. The second electrode (left) records membrane potential at various distances from the current electrode. (B) Potential (V_m) measured along the axon as a function of distance (x) from the point of current injection. Decay of voltage is exponential, with a length constant λ. (C) Equivalent electrical circuit, assuming zero resistance in the external fluid and ignoring membrane capacitance. r_i = longitudinal resistance of axoplasm per unit length; r_m = membrane resistance of a unit length.

Расчет сопротивления мембраны и внутреннего сопротивления

Постоянная длины волокна зависит как от r_m, так и от r_i:

$$\lambda = \left(\frac{r_m}{r_i}\right)^{1/2}.$$

Величина измеряется в сантиметрах и отвечает интуитивному представлению о том, что расстояние, на которое распространяется изменение потенциала, должно возрастать с увеличением сопротивления мембраны (которое препятствует потере тока за счет утечки) и, напротив, должно снижаться с увеличением внутреннего сопротивления (которое затрудняет протекание тока вдоль содержимого волокна).

Точно так же входное сопротивление зависит от обоих параметров:

$$r_{input} = 0{,}5(r_m r_i)^{1/2}.$$

Выражение измеряется в должных единицах (Ом) и подразумевает возрастание входного сопротивления с увеличением как одного, так и другого параметров. Фактор 0,5 объясняется тем, что аксон простирается в двух направлениях от места инъекции тока. Каждая половинка обладает входным сопротивлением, равным $(r_m r_i)^{0,5}$.

Зная эти выражения, можно получить параметры сопротивления мембраны и аксоплазмы из опытов, подобных показанному на рис. 7.1. Измерив экспериментально r_{input} и λ, можно путем простых преобразований получить выражения для r_m и r_i:

$$r_m = 2r_{input}\lambda, \quad r_i = \frac{2r_{input}}{\lambda}.$$

Удельное сопротивление

Рассчитанные значения r_m и r_i характеризуют сопротивление цилиндрического сегмента аксона длиной 1 см. Однако, они не предоставляют точной информации о сопротивлении самой мембраны, а также аксоплазмы, поскольку последние зависят от размера волокна. При равных прочих условиях, сантиметровый отрезок тонкого волокна должен обладать более высоким сопротивлением мембраны, чем отрезок более толстого волокна

той же длины, поскольку у тонкого волокна площадь поверхности мембраны меньше, чем у толстого. С другой стороны, если в мембране тонкого волокна плотность каналов значительно выше, то сопротивление сантиметрового участка его мембраны может в результате оказаться таким же, как и у толстого волокна.

Для того, чтобы *сопоставить* мембраны между собой, нужно знать величину удельного сопротивления, которое равно сопротивлению мембраны площадью 1 $см^2$ и измеряется в Ом · $см^2$. Отрезок аксона длиной 1 см и радиусом a обладает площадью поверхности $2\pi a$ $см^2$. Сопротивление мембраны r_m такого отрезка можно получить, разделив R_m на площадь мембраны: $r_m = R_m/(2\pi a)$. Преобразовав выражение, получим

$$R_m = 2\pi a r_m.$$

Величина R_m важна тем, что не зависит от геометрических свойств мембраны и потому позволяет сравнивать между собой мембраны самых разных размеров и форм.

В большинстве типов нейронов R_m определяется главным образом калиевой и хлорной проницаемостями мембраны в покое (глава 5), величина которых зависит от типа клетки. Среднее значение R_m, полученное Ходжкиным и Раштоном на аксоне омара, составляет приблизительно 2 000 Ом · $см^2$; данные, полученные в других препаратах, варьировали в диапазоне от 1 000 Ом · $см^2$ в мембранах с большим количеством каналов до 50 000 Ом · $см^2$ в мембранах со сравнительно небольшим числом каналов.

Удельным сопротивлением (R_i) аксоплазмы называется внутреннее продольное сопротивление участка аксона длиной 1 см и площадью сечения 1 $см^2$. Эта величина также не зависит от геометрических свойств аксона и определяется тем, насколько свободно ионы способны перемещаться во внутриклеточном пространстве. Чтобы получить R_i из r_i, нужно вспомнить, что с увеличением площади сечения цилиндра его продольное сопротивление уменьшается. Следовательно, сопротивление участка аксона длиной 1 см (r_i) можно выразить как частное величины R_i и площади сечения: $r_i = R_i/(\pi a^2)$. Отсюда получим:

$$R_i = r_i \pi a^2.$$

Величина R_i измеряется в Ом · см. Для аксона кальмара ее значение составляет приблизительно 30 Ом · см при 20° С, что в 10^7 раз выше, чем удельное сопротивление меди. Величина эта соответствует ожиданиям для ионного состава аксоплазмы кальмара[3)]. У млекопитающих ионная концентрация в цитоплазме ниже, а удельное сопротивление выше, около 125 Ом · см при 37° С. У лягушек, при еще более низкой ионной концентрации, величина удельного сопротивления при 20° С составляет приблизительно 250 Ом · см.

Влияние диаметра кабеля на его характеристики

Как будет влиять диаметр волокна на его кабельные параметры r_{input} и λ при данных значениях удельного сопротивления аксоплазмы R_i и удельного сопротивления мембраны R_m? Ответ можно получить на основе уравнений, приведенных выше. Начнем с входного сопротивления. Мы знаем, что $r_{input} = 0{,}5(r_m r_i)^{1/2}$ и $r_m = R_m/(2\pi a)$, $r_i = R_i/(\pi a^2)$.

Преобразовав эти выражения, получим:

$$r_{input} = 0{,}5\left(\frac{R_m R_i}{2\pi^2 a^3}\right)^{1/2}.$$

Следовательно, с увеличением диаметра волокна a входное сопротивление снижается как 3/2 степень радиуса.

Подобным же образом найдем постоянную длины:

$$\lambda = \left(\frac{a R_m}{2 R_i}\right)^{1/2}.$$

При равных прочих условиях λ возрастает с увеличением радиуса волокна как квадратный корень радиуса. Этим параметром можно пользоваться при сравнении различных волокон между собой, если принять, что удельное сопротивление мембраны равно 2 000 Ом · $см^2$ в каждом случае. Аксон кальмара длиной 1 см с удельным внутренним сопротивлением 30 Ом · см должен обладать постоянной длины почти 13 мм. Мышечное волокно лягушки, благодаря своему меньшему диаметру и более высокому удельному внутреннему сопротивлению, при диаметре 50 мкм имеет постоянную длины, равную всего 1,4 мм, а нервное волокно млекопитающих диаметром 1 мкм — всего 0,3 мм.

Обобщим вышесказанное. Кабельные параметры r_{input} и λ определяют величину сигнала, генерируемого нервным волокном, а также расстояние, на которое этот сигнал способен распространиться. Например,

при равных прочих характеристиках, величина возбуждающего синаптического потенциала (глава 9) будет больше в тонком дендрите (с более высоким r_{input}), чем в толстом. С другой стороны, в толстом дендрите потенциал будет распространяться на бóльшие расстояния по направлению к телу клетки, чем в тонком (благодаря большему значению λ). Тем не менее, r_{input} и λ зависят не только от размера волокна, но и от резистивных свойств цитоплазмы и мембраны. Можно с высокой степенью аккуратности считать, что значение удельного сопротивления цитоплазмы одинаково для любых клеток независимо от класса животного. Удельное сопротивление мембраны, напротив, различно для разных типов клеток и может отличаться в десятки раз.

Емкость мембраны

Мембрана клетки не только проводит ионные токи, но и накапливает заряд на своей внешней или внутренней поверхности (глава 5). С точки зрения теории электричества, разделение зарядов на мембране означает, что мембрана обладает свойствами конденсатора. В общем виде конденсатор состоит из двух проводящих пластин, отделенных друг от друга изолирующим материалом; в промышленных конденсаторах проводящие пластины обычно сделаны из металлической фольги, а изолирующая прослойка между ними — из пластика. В случае нервной клетки проводниками являются два слоя жидкости, находящиеся по обе стороны мембраны, а сама мембрана играет роль изолирующей прослойки. При зарядке конденсатора от батареи на одной из пластинок накапливается положительный заряд, в то время как на второй пластинке создается равный по величине запас отрицательного заряда. Емкость конденсатора (C) определяется количеством заряда (Q), запасаемым на один вольт потенциала (V), приложенного к пластинам конденсатора: $C = Q/V$. C измеряется в кулонах, деленных на вольт, т. е. в фарадах (Ф). Чем ближе друг к другу расположены пластины, тем более эффективно конденсатор способен разделять и накапливать заряд. Поскольку толщина мембраны клетки всего 5 нм, она способна накапливать достаточно большой заряд. Обычно емкость мембраны нервных клеток составляет 1 мкФ/см^2. Преобразовав выражение, получаем $Q = CV$. При потенциале покоя −80 мВ, количество избыточного отрицательного заряда на внутренней стороне мембраны составит $(1 \cdot 10^{-6}) \times (80 \cdot 10^{-3}) = 8 \cdot 10^{-8}$ кулонов, деленных на см^2, что соответствует $5 \cdot 10^{11}$ одновалентных ионов (0,8 пмоль) на квадратный сантиметр мембраны.

Величину тока, протекающего внутрь конденсатора или из него, можно подсчитать на основе соотношения заряда и напряжения, учитывая, что ток (i, в амперах) есть скорость изменения заряда во времени, т. е. 1 ампер = (1 кулон)/(1 с). Поскольку $Q = C/V$, получим:

$$i = \frac{dQ}{dt} = C\frac{dV}{dt}.$$

Скорость изменения заряда на конденсаторе прямо пропорциональна величине тока. Если ток постоянен, то потенциал будет меняться с постоянной скоростью $dV/dt = i/C$.

Соотношение тока и напряжения в цепи, содержащей резисторы (сопротивления) и конденсаторы (емкости), соединенные параллельно, проиллюстрировано на рис. 7.2. Прямоугольный скачок тока величиной i, приложенный к резистору (R), создает скачок напряжения на резисторе величиной $V = iR$ (рис. 7.2A). Если тот же скачок тока приложить к конденсатору (C), то напряжение на конденсаторе будет накапливаться со скоростью $dV/dt = i/C$ (рис. 7.2B). Когда эти два элемента, резистор и конденсатор, соединены параллельно (рис. 7.2C), то весь ток пойдет сначала на зарядку конденсатора со скоростью i/C; однако, как только на конденсаторе накопится какой-то заряд, ток потечет и через резистор. По мере нарастания тока, все бóльшая его часть будет проходить через сопротивление, потому что скорость зарядки конденсатора будет постепенно снижаться. В конце концов весь ток будет течь через резистор, создавая на нем потенциал $V = iR$, а конденсатор будет полностью заряжен. По завершении скачка тока заряд из конденсатора постепенно рассеется на резисторе, а напряжение вернется к нулю.

Постоянная времени

Нарастание и спад потенциала происходит по экспоненциальной кривой, как показано на рис. 7.2B. Фаза роста описывается уравнением:

$$V = iR(1 - e^{-t/\tau}),$$

где t — время от начала импульса. Постоянная времени τ равна произведению RC. Это время, за которое потенциал возрастает

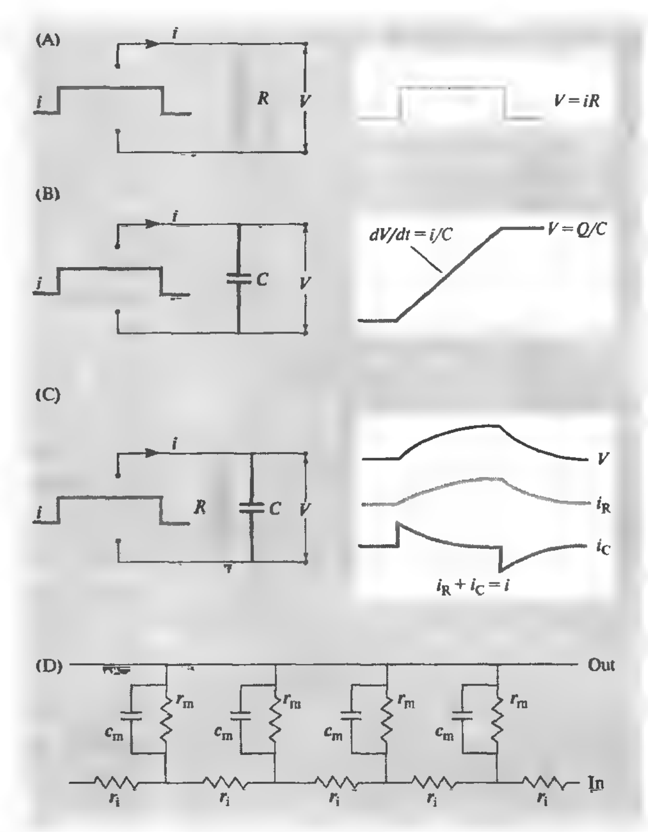


Рис. 7.2. Влияние емкости на временной ход изменения потенциала. (A) Потенциал, создаваемый прямоугольным скачком тока в цепи, содержащей исключительно резисторы. (B) В цепи, состоящей из одних емкостей, скорость изменения потенциала пропорциональна величине прилагаемого тока. (C) Ток в цепи, содержащей как резисторы, так и емкости. (D) Электрическая схема из рис. 7.1C с добавлением удельной емкости мембраны.

Fig. 7.2. Effect of Capacitance on Time Course of potentials. (A) Potential (V) produced by a rectangular pulse of current (i) in a purely resistive network. Voltage is proportional to, and has the same time course as, the applied current. (B) In a purely capacitative network the *rate of change* of voltage is proportional to the applied current. (C) In a combined RC network the initial surge of current is into the capacitor (i_C); by the end of the pulse all of the current flows through the resistor (i_R). Voltage rises to the final value i_R exponentially with time constant $\tau = RC$. After termination of the current pulse, the capacitance discharges through the resistance with the same time constant and i_C and i_R are equal and opposite. (D) Electrical model of a cable as in Figure 7.1C, but with membrane capacitance per unit length (c_m) added.

до 63 % $(1 - 1/e)$ своего максимального значения. Спад напряжения тоже экспоненциален, с той же постоянной времени. Ток через резистор, i_R, должен изменяться во времени по тому же закону, что и напряжение. Следовательно, на фазе роста ток начинает расти от нуля до своего максимального значения i. Емкостной ток, наоборот, начинается с величины i и спадает до нуля по экспоненте с той же постоянной времени. По завершении импульса, поскольку внешнего источника тока нет, единственным током на резисторе будет ток, генерируемый напряжением на конденсаторе. Следовательно, ток на резисторе равен по величине емкостному току и противоположен ему по направлению, как показано на рисунке.

Вышеописанную цепь, состоящую из параллельно соединенных резистора и конденсатора, можно использовать для описания сферической нервной клетки, аксон и дендриты которой настолько малы, что их вкладом в электрические свойства клеток можно пренебречь. В эквивалентной цепочке для аксона или мышечного волокна как емкость мембраны, так и ее сопротивление распределены по всей длине волокна, как показано на рис. 7.2D. Емкость мембраны на единицу длины c_m (измеряемая в мкФ/см) зависит от удельной емкости на единицу площади C_m (в мкФ/см²) по формуле $c_m = 2\pi a C_m$, где a — радиус волокна.

Постоянная времени мембраны сферической клетки или волокна ($\tau_m = R_m C_m$) не зависит от размера клетки или волокна. Причина этого в том, что увеличение радиуса (а следовательно, и площади поверхности мембраны) влечет за собой не только увеличение емкости, но и соответствующее снижение сопротивления, так что произведение двух величин не меняется. Поскольку показано, что величина C_m приблизительно одинако-

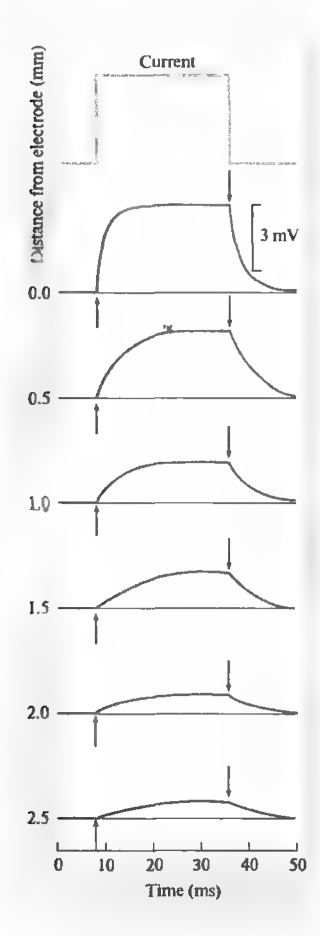


Рис. 7.3. Распространение потенциала вдоль аксона омара, регистрируемое с помощью поверхностного электрода.

Fig. 7.3. Spread of Potential along a lobster axon, recorded with a surface electrode. A rectangular current pulse is applied at 0 mm, producing an electrotonic potential. With increasing distance from the site of current injection, the rise time of the potential change is slowed and the height of the plateau attenuated. (After Hodgkin and Rushton, 1946.)

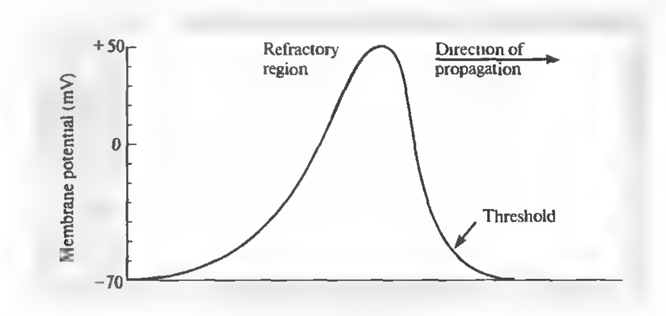
ва для всех нервных и мышечных волокон (1 мкФ/см^2), то величина τ является удобным параметром, характеризующим удельное сопротивление мембраны для данной клетки. Постоянная времени — это третий параметр, который, наряду с входным сопротивлением и постоянной длины, характеризует поведение аксона. Диапазон значений постоянной времени в различных типах нервных и мышечных клеток составляет от 1 до 20 мс.

Емкость в кабеле

Каково влияние постоянной времени на ток в кабеле? Как и в случае простой *RC*-цепочки (рис. 7.2С), нарастание и спад потенциала в ответ на скачкообразное изменение тока замедляется благодаря наличию конденсатора. Ситуация осложняется тем, что ток течет уже не через один конденсатор, но каждый сегмент цепочки является одним из резистивно-емкостных элементов, взаимодействующих между собой. Благодаря этим взаимодействиям временной ход в отдельном сегменте нельзя описать простой экспонентой, и фазы роста и спада замедляются по мере удаления от точки инъекции тока (рис. 7.3). Поскольку скорость нарастания потенциала зависит от расстояния между отводящим электродом и местом инъекции тока, постоянную времени спада уже нельзя рассчитать на основе простого измерения времени 63 %-ного роста потенциала, за исключением единственной точки вдоль волокна, в которой это расстояние равно постоянной длины.

Обратимся к рассмотрению движения ионов. Если в аксон инъецирован положительный ток, внутриклеточные ионы (главным образом, калия) будут распространяться вдоль волокна. Некоторая часть ионов уйдет на изменение заряда на емкости мембраны, другая часть будет протекать по мембранному сопротивлению. Одновременно с этим процессом будет происходить перемещение отрицательных ионов в противоположном направлении. Постепенно потенциал на мембране достигнет нового устойчивого значения, емкости, распределенные по мембране, будут полностью заряжены до нового уровня потенциала, а через мембрану будет протекать постоянный ионный ток. Время, необходимое для достижения нового устойчивого состояния, определяется постоянной времени.

Еще одно следствие наличия мембранной емкости заключается в том, что короткие сигналы распространяются на более короткие расстояния, чем длительные сигналы. В случае достаточной длительности сигнала, в течение которого потенциал успевает достигнуть своего максимального значения, емкость заряжается полностью, и пространственное распределение потенциала определяется сопротивлениями мембраны и цитоплазмы: $V_x = V_0 e^{-x/\lambda}$. Для коротких импульсов, таких как синаптический потенциал, ток прекращается еще до того, как емкость успевает полностью зарядиться. Это выражается



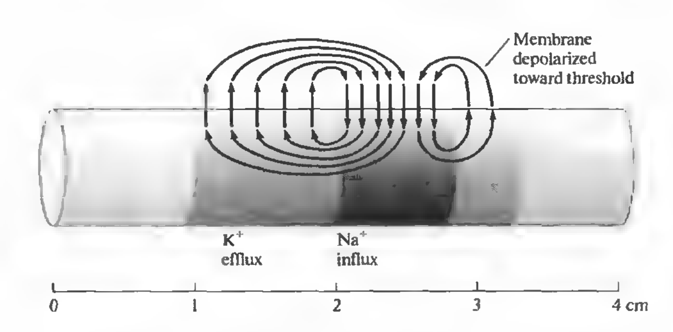


Рис. 7.4. Мембранный ток во время прохождения потенциала действия.

Fig. 7.4. Current Flow during an Action Potential at an instant in time. Rapid depolarization during the rising phase of the action potential is due to the influx of positively charged sodium ions. The positive current spreads ahead of the impulse to depolarize the adjacent segment of membrane toward threshold. Repolarization on the falling phase is due to the efflux of potassium ions.

в уменьшении расстояния, на которое потенциал распространяется вдоль волокна. Другими словами, эффективная постоянная длины для коротких сигналов меньше, чем для длительных. Кроме того, форма коротких сигналов искажается по мере их перемещения по волокну, а их амплитуда снижается за счет «закругления» пика, достигаемого все позднее и позднее.

§ 2. Распространение потенциала действия

Продвижение потенциала действия вдоль нервного волокна зависит от пассивного распространения тока в соседние участки мембраны, которое вызывает в них деполяризацию до порогового уровня. Для иллюстрации этого свойства представим себе потенциал действия, «замерший» во времени, и обрисуем общую картину распределения потенциала вдоль волокна, как показано на рис. 7.4. Размер участка мембраны, находящегося под влиянием потенциала действия, зависит от его длительности и скорости проведения. К примеру, если длительность потенциала действия равна 2 мс, а скорость его проведения 10 м/с (10 мм/мс), то потенциал распространится на участке мембраны с 2 см. В том месте, где мембранный потенциал достиг порога (т. е. на переднем фронте потенциала действия), происходит массивный вход натрия в направлении электрохимического градиента, приводящий к дальнейшей деполяризации мембраны. Как и в случае инъекции тока через микроэлектрод, входящий ток распространяется в продольном направлении от активного участка. Этот распространяющийся ток вызывает деполяризацию участка, соседнего с активным, до порогового уровня. Позади от пика потенциала действия, напротив, калиевая проводимость настолько высока, что ток через калиевые каналы вызывает реполяризацию мембраны до уровня покоя.

Импульсы обычно зарождаются в одном конце аксона и перемещаются к другому его концу. Однако, не существует предпочтительного направления распространения импульса. Импульсы, производимые в нейромышечном соединении, расположенном в середине мышечного волокна, распространяются в обоих направлениях от середины мышцы к сухожилию. Тем не менее, за редким исключением потенциал действия не способен изменить направления своего движения по волокну. Причина этого в рефрактерном периоде. В зоне рефрактерности, показанной на рис. 7.4,

натриевые каналы в основном инактивированы, а калиевая проводимость высока, поэтому распространение регенерирующего процесса в обратную сторону невозможно. После того, как потенциал действия ушел из данного участка волокна, мембранный потенциал возвращается к уровню покоя, инактивация натриевых каналов снимается, калиевая проводимость снижается до нормального уровня, и участок вновь становится возбудимым.

Скорость проведения

Скорость проведения потенциала действия зависит от того, насколько быстро и насколько далеко впереди от активного участка происходит, благодаря распространению положительного заряда, деполяризация мембраны до порогового уровня. Это, в свою очередь, зависит от величины тока, генерируемого в активном участке, а также от кабельных свойств волокна. Если постоянная времени мембраны, $\tau_m = R_m C_m$, мала, то мембрана будет деполяризоваться быстро, что ускорит проведение. Если постоянная длины, $\lambda = (r_m/r_i)^{1/2}$, велика, то деполяризующий ток будет распространяться на большое расстояние от активного участка,что также увеличит скорость проведения.

Как эти факторы соотносятся с размером волокна? Как уже отмечалось выше, постоянная времени не зависит от размера. Постоянная длины, напротив, пропорциональна квадратному корню диаметра волокна. Следовательно, толстые волокна проводят быстрее, чем тонкие. Более детальное теоретическое рассмотрение показывает, что в немиелинизированных волокнах, таких как аксон кальмара, скорость проведения должна быть прямо пропорциональна корню квадратному диаметра волокна[4)].

Миелинизированные нервы и сальтаторная проводимость

В нервной системе позвоночных нервные волокна большего диаметра обычно миелинизированы. На периферии миелин образуют шванновские клетки, а в ЦНС — олигодендроциты (глава 8). Эти клетки плотно облегают нейроны, обвиваясь вокруг них. Мембраны так плотно соприкасаются друг с другом, что цитоплазма выдавливается из зазора между ними, в результате чего образуются тесно упакованные спиральные мембранные «обертки» (глава 8). Количество оберток (ламелей) варьирует от 10–20 до 160[5)]. Наличие 160 ламелей означает, что между плазматической мембраной аксона и внеклеточной жидкостью последовательно располагается 320 мембран. Таким образом, эффективное сопротивление мембраны возрастает в 320 раз, и во столько же раз снижается мембранная емкость. Миелин составляет обычно от 20 до 40 % общего диаметра волокна. Миелиновая оболочка прерывается через равные промежутки так называемыми перехватами Ранвье, в которых собственная мембрана аксона не покрыта миелином. Расстояние между перехватами обычно в 100 раз превосходит внешний диаметр волокна и составляет от 0,2 до 2 мм.

Функция миелиновой оболочки состоит в том, чтобы обеспечить протекание тока главным образом в перехватах, благодаря высокому сопротивлению и низкой емкости миелинизированных участков мембраны между ними. В результате возбуждение перемещается скачкообразно от перехвата к перехвату, и скорость проведения при этом значительно возрастает. Такое импульсное проведение получило название **сальтаторного** (от латинского *saltare* — прыгать). Сальтаторное проведение не означает, что потенциал действия может протекать лишь в одном перехвате Ранвье в каждый отдельно взятый момент. В то время как возбуждение распространяется на очередной перехват, многие предыдущие перехваты по-прежнему пребывают в активированном состоянии. Миелинизированные аксоны не только проводят возбуждение быстрее немиелинизированных, но и способны проводить импульсы более высокой частоты в течение более долгого времени. Эти преимущества следует отнести на счет еще одного последствия миелинизации, а именно того, что в процессе проведения импульса меньшее количество натрия и калия проникает через мембрану, поскольку регенеративные процессы протекают в основном в перехватах Ранвье. Следовательно, меньше метаболической энергии затрачивается на поддержание внутриклеточных ионных концентраций.

Сальтаторное проведение впервые продемонстрировали в 1941 году Тасаки[6)] и, позднее, Хаксли и Штемпфли[7)], которые регистрировали ток в перехватах и межперехватных участках. Подобный эксперимент на изолированном миелинизированном аксоне показан на рис. 7.5. Нерв помещен в три ванночки с растворами солей, средняя из которых

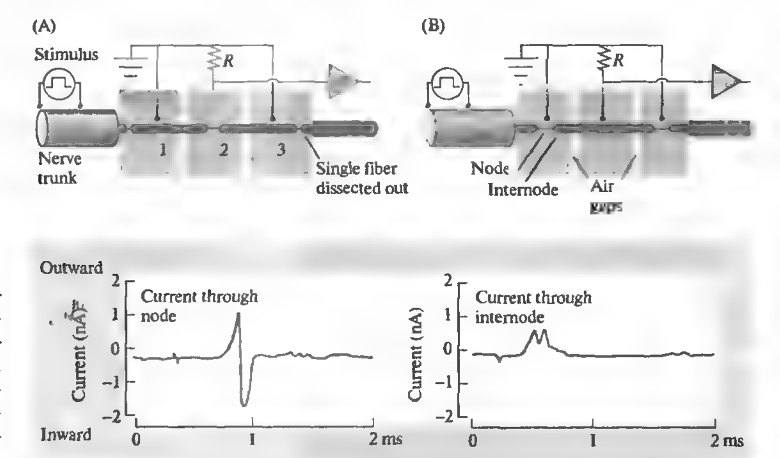


Рис. 7.5. Ток, протекающий в миелинизированном волокне. (А) Перехват Ранвье расположен в средней ванночке (номер 2). (В) В средней ванночке находится межперехватный участок.

Fig. 7.5. Current Flow through a Myelinated Axon. A single myelinated axon passes through two air gaps that create three compartments not linked by extracellular fluid. During the propagated action potential, currents into and out of the center compartment (2) flow through the resistor (R); the voltage drop across the resistor provides a measure of the current. (A) A node of Ranvier is in compartment 2. Initially, as the action potential approaches and the node is being depolarized, current flows through the resistor from compartment 2 to compartment 1 (upward deflection); when threshold is reached at the node, a large inward flux follows and the current is reversed. (B) An internode is in the center compartment and there is only outward current flow from the compartment, with no inward current, as the action potential first approaches and then leaves the internodal segment. (After Tasaki, 1959.)

была более узкой и отделялась от остальных воздушными прослойками с высоким сопротивлением. Ванночки соединены между собой внешней электрической цепью, как показано на рисунке, благодаря чему ток не прерывается воздушными прослойками, но протекает из центральной ванночки через резистор (R). Падение напряжения на резисторе позволяет измерить величину и направление токов.

В первом опыте (рис. 7.5А) в центральной ванночке находился перехват Ранвье. В результате раздражения нерва ток сначала вытекает из перехвата наружу и обратно в сторону активного участка (восходящая часть кривой) по мере того, как перехват деполяризуется до порогового уровня. Затем следует входящий ток (нисходящая часть кривой), протекающий в ходе генерации потенциала действия. Если в средней ванночке располагался миелинизированный (межперехватный) участок аксона (рис. 7.5В), то входящий ток отсутствовал, и регистрировали лишь небольшие отклонения за счет емкостного и резистивного токов из средней ванночки в направлении возбужденных участков. Подобные опыты подтвердили, что входящего тока, а следовательно и регенеративного процесса в межперехватных участках нет.

Изощренные методы регистрации сальтаторного проведения в нерассеченных аксонах млекопитающих были разработаны Бостоком и Сирсом[8]. Эти методы позволяют измерять как входящие токи в перехватах, так и продольные токи в межперехватных участках, давая возможность точно определить положение перехватов Ранвье и расстояния между ними.

Скорость проведения в миелинизированных волокнах

Диапазон возможных значений скорости проведения в миелинизированных волокнах широк: от нескольких метров в секунду до 100 м/с. Мировой рекорд принадлежит миелинизированным аксонам креветки, которые проводят возбуждение быстрее 200 м/с[9]. В нервной системе позвоночных нервы разделяются на группы по скорости проведения[10] или по функции. В соответствии с теоретическими расчетами, скорость проведения в волокне должна быть пропорциональна его диаметру[11]. Бойд и коллеги показали, что у млекопитающих скорость проведения (в м/с) для толстых миелинизированных волокон приблизительно равняется их внешнему диаметру (в м), помноженному на 6. Для более тонких волокон коэффициент пропорциональности приблизительно равен 4,5[12].

Интересным с точки зрения теории представляется такой параметр, как оптимальная толщина миелиновой оболочки, обеспечивающая максимальную скорость проведения при данном внешнем диаметре волокна. Очевидно, что чем толще миелиновая оболочка, тем больше возрастет сопротивление мембраны аксона. С другой стороны, с увеличением толщины миелиновой оболочки уменьшается площадь поперечного сечения аксоплазмы и, следовательно, возрастет ее внутреннее продольное сопротивление. Первый из этих факторов влечет за собой ускорение проведения, второй — его замедление. Показано, что оптимальное значение толщины миелиновой оболочки достигается, когда диаметр аксона составляет приблизительно 0,7 от общего диаметра волокна. Как уже отмечалось, наблюдаемые соотношения в периферических нервах млекопитающих варьируют от 0,6 до 0,8.

Теоретически рассчитанное оптимальное расстояние между перехватами также совпадает с реально существующим: оно превосходит диаметр аксона приблизительно в 100 раз. Большее расстояние между перехватами повышает скорость проведения. С другой стороны, ток, достигающий следующего перехвата Ранвье через более длинный межперехватный отрезок, будет ослаблен за счет противодействия продольного сопротивления. В результате деполяризация в перехвате будет развиваться медленнее, и скорость проведения снизится. Благодаря этим двум противоборствующим факторам небольшие вариации межперехватного расстояния вокруг оптимального значения почти не влияют на скорость проведения. При слишком большом межперехватном расстоянии, очевидно, деполяризация от предыдущего перехвата не достигнет порога, и проведение прекратится.

Распределение каналов в миелинизированных волокнах

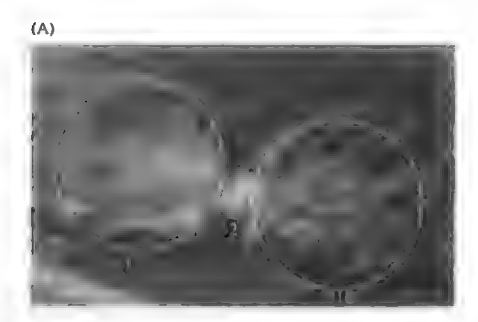
Натриевые каналы в миелинизированных волокнах сконцентрированы в перехватах Ранвье, в то время как калиевые каналы собраны в приперехватных областях оболочки[13]. Впервые свойства приперехватных областей, обычно покрытых миелином, были изучены Ричи и коллегами[14]. Для этого миелиновую оболочку ослабили с помощью ферментов или осмотического шока. Отведения с фиксацией потенциала, сделанные на обработанном участке, сравнивали с результатами, полученными до его обработки. Эксперимент показал, что в норме, при возбуждении нерва кролика, в перехватах Ранвье возникает лишь входящий ток. Реполяризация обеспечивается не за счет увеличения калиевой проводимости, как во всех описанных выше типах клеток, а в результате быстрой инактивации натриевых каналов, а также утечки ионов через достаточно большую проводимость покоя. После очистки участка, соседнего с перехватом Ранвье, от миелина в нем был зарегистрирован выходящий калиевый ток при полном отсутствии натриевого тока. Эти наблюдения показали, что в свежеочищенной от миелина мембране содержатся калиевые каналы типа «выпрямитель с задержкой», но не натриевые каналы. Более поздние исследования с использованием иммуногистохимических методов подтвердили, что потенциалзависимые калиевые каналы в миелинизированном нерве крысы собраны в приперехватных участках (рис. 7.6А)[15, 16]. Интересно отметить, что в самих перехватах аксона лягушки *Xenopus* содержится другой тип калиевых каналов — *натрий-активируемые* калиевые каналы[17]. Эти каналы могут открываться в ответ на вход натрия на фазе роста потенциала действия и, тем самым, способствовать реполяризации мембраны.

Каналы в демиелинизированных аксонах

В аксонах млекопитающих, миелиновая оболочка которых была удалена при помощи хронической обработки токсином дифтерии, появляется постоянная проводимость в демиелинизированных областях[7]. Эти данные указывают на то, что в областях, очищенных от миелина, появляются потенциалзависимые натриевые каналы. В опытах с использованием антител, способных метить натриевые каналы, было показано, что после демиелинизации аксона каналы исчезают из областей перехватов Ранвье, в то время как вновь появившиеся каналы распределяются вдоль ранее миелинизированных участков (рис. 7.6В)[18]. Потенциалзависимые калиевые каналы также перераспределяются[14, 19]. После восстановления миелиновой оболочки натриевые каналы вновь концентрируются на перехватах, а калиевые — в приперехватных областях.

Геометрическое строение и блок проводимости

Модель простого однородного кабеля хорошо описывает немиелинизированный аксон,



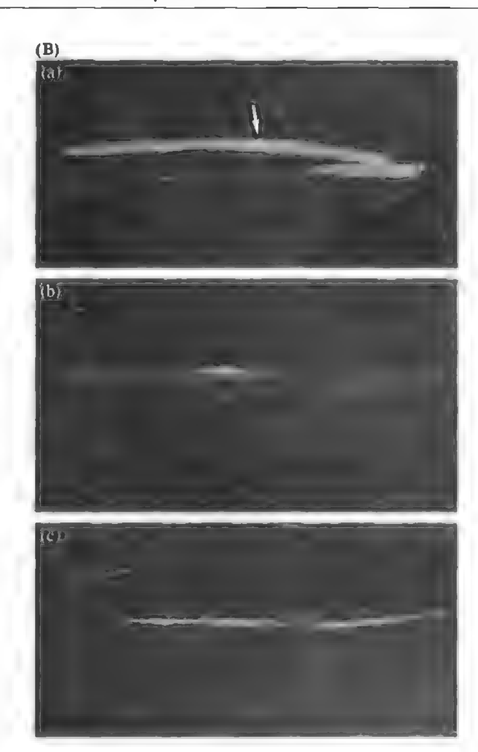


Рис. 7.6. Распределение натриевых и калиевых ионных каналов в миелинизированных аксонах. (А) Натриевые (1) и калиевые (2) каналы в седалищном нерве крысы. (В) Перераспределение натриевых каналов после демиелинизации бокового нерва золотой рыбки: (a) миелинизированный аксон, (b) 14 дней после демиелинизации, (c) 21 день после демиелинизации.

Fig. 7.6. Distribution of Sodium and Potassium Channels in myelinated axons. (A) In rat sciatic nerve, sodium channels (2) are tightly clustered in the node of Ranvier, and potassium channels (1) are sequestered in the paranodal region. Note the sharp decrease in axon diameter within the node. (B) Disruption of sodium channel distribution after demyelination of goldfish lateral-line nerve. In the myelinated axon (a), sodium channels are concentrated at the node (arrow). Fourteen days after the beginning of demyelination (b), sodium channels appear in irregular patches. At 21 days (c), more patches have appeared, distributed along the length of the nerve. (A after Rasband et al. 1998, kindly provided by P. Shrager; B after England et al. 1996, kindly provided by S. R. Levinson.)

но отнюдь не целый нейрон с телом, развитыми дендритными разветвлениями и многочисленными ветвями аксона. Сложная пространственная организация нейронов предоставляет многочисленные варианты блока проведения импульсов. В частности, проведение прервется в любом расширяющимся участке дендрита, поскольку активированная потенциалом действия мембрана в тонком участке не сможет предоставить достаточного деполяризующего тока для надпороговой активации мембраны с большей площадью в соседнем участке. Такая ситуация может возникнуть в месте раздвоения дендрита, когда активная мембрана нераздвоенного участка должна предоставить достаточное количество тока, чтобы деполяризовать два последующих участка. В нормальных условиях один импульс проходит через такое разветвление, однако при повторном раздражении может возникнуть блок. К блоку могут привести и другие факторы: в сенсорных нейронах пиявки, например, к нарушению проводимости может привести повторная гиперполяризация за счет увеличения электрогенной активности натриевых насосов (глава 15), а также благодаря долговременному увеличению калиевой проницаемости, которое также способно повысить порог возбуждения[20)–22)].

В миелинизированных периферических волокнах фактор надежности проведения приблизительно равен 5: это означает, что ток из активного перехвата Ранвье создает деполяризацию на следующем перехвате, которая в 5 раз превышает пороговый уровень. В местах разветвления дендритов фактор надежности снижается. Также, на тех участках, где заканчивается миелиновая оболочка (например, ближе к концу моторного нерва), ток из последнего перехвата распределяется на большую площадь немиелинизированной мембраны нервного окончания, и, следовательно, производит меньшую деполяризацию, чем в перехватах Ранвье. Возможно, именно по этой причине последние межперехватные участки перед немиелинизированным окончанием обычно бывают несколько короче: благодаря этому большее количество перехватов сможет принять участие в деполяризации нервного окончания[23)].

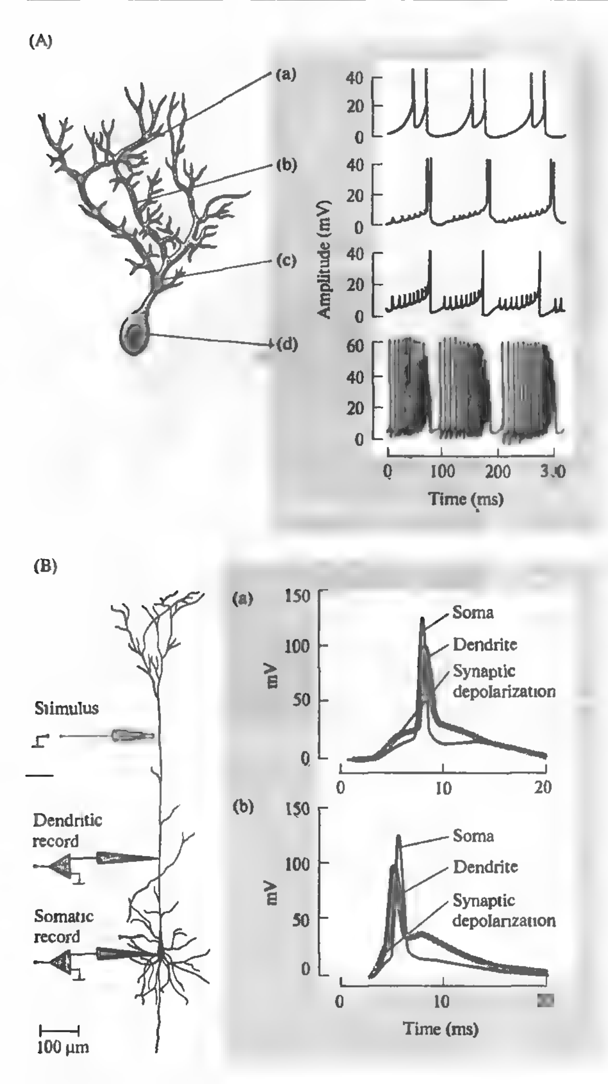


Рис. 7.7. Распространение потенциала действия в дендритах. (А) Отведения от клетки Пуркинье в мозжечке, полученные внедрением электрода в указанных местах и инъекцией через него деполяризующего тока. Ответы на деполяризацию, созданную (а) ближе к краю дендритного дерева, (b) и (с) в средних положениях и (d) на соме клетки. (В) Проведение в пирамидальной клетке коры. (а) Небольшая деполяризация пассивно распространяется к соме и вызывает в ней потенциал действия. (b) Более высокий уровень деполяризации вызывает кальциевый потенциал действия в дендрите.

Fig. 7.7. Spread of Action Potentials in Dendrites. (A) Records from a cerebellar Purkinje cell, obtained by impaling the cell at the indicated locations and passing a depolarizing current through the electrode. Near the end of the dendritic tree (a), depolarization produces long-duration calcium action potentials. In the cell soma (d), a steady depolarizing current produces high-frequency sodium action potentials, interrupted periodically by calcium action potentials. At intermediate locations (b and c), depolarization produces calcium action potentials in the dendrite. Accompanying sodium action potentials, generated in the soma, spread passively into the dendritic tree and die out after a short distance. (B) Conduction in a cortical pyramidal cell. The cortical cell dendrite is depolarized by activating distal excitatory synapses. (a) Moderate depolarization of the dendrite is attenuated as it spreads to the soma, where it initiates an action potential. The action potential then spreads back into the dendrite. (b) Larger depolarization produces a calcium action potential in the dendrite that precedes action potential initiation in the soma. (A from Llinàs and Sugimori, 1980; B after Stuart, Schiller, and Sakmann, 1997.)

§ 3. Проведение в дендритах

Независимо от геометрического строения, порог возбуждения некоторых участков мембраны нейрона ниже, чем у других. Впервые это было отмечено Экклсом[24] и коллегами. Они обнаружили, что при деполяризации потенциал действия сначала зарождается в области аксона, расположенной между телом клетки и первым межперехватным участком, а затем распространяется по аксону, а также назад в тело клетки и в дендриты. Примерно в то же время Куффлер и Айзагир показали, что деполяризация мембраны дендритов рецепторов растяжения рака вызывает потенциал действия не в самих дендритах, а в теле клетки или около него[25]. Подобные наблюдения привели ученых к мысли о том, что дендриты не способны к возбуждению и служат лишь для пассивного проведения сигналов от дендритных синапсов до начального сегмента аксона. Гипотеза эта возникла вопреки большому количеству данных, противоречащих ей. Например, ранние опыты с внеклеточной регистрацией в моторной коре млекопитающих, проделанные Ли и Джаспером, убедительно продемонстрировали, что потенциал действия способен распространяться по ден-

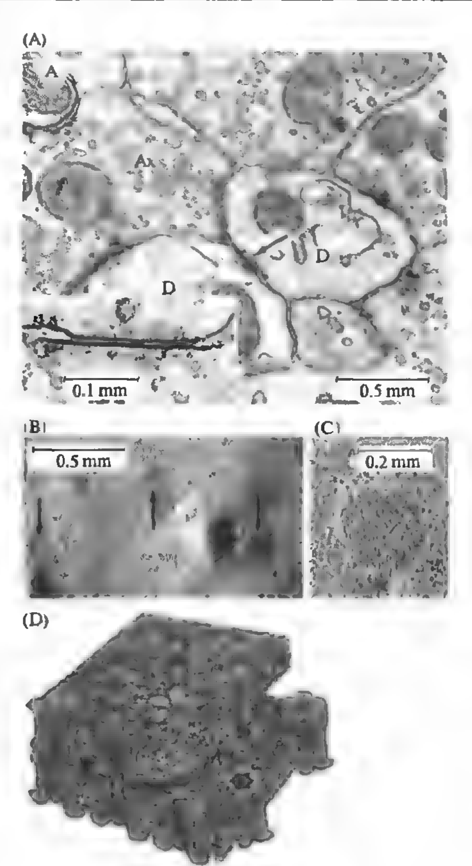


Рис. 7.8. Щелевые соединения между нейронами. (A) Соединение между двумя дендритами указано стрелкой. (B) Расколотая после заморозки пресинаптическая мембрана; скопления частиц, образующих щелевые соединения, показаны стрелками. (C) Одно из мест скопления частиц при большем увеличении. (D) Отдельные коннексоны, пронизывающие пространство между клетками.

Fig. 7.8. Gap Junctions between neurons. (A) Two dendrites (labeled D) in the inferior olivary nucleus of the cat are joined by a gap junction (arrow), shown at higher magnification in the inset. The usual space between the cells is almost obliterated in the contact area, which is traversed by cross-bridges. (B) Freeze-fracture through the presynaptic membrane of a nerve terminal that forms gap junctions with a neuron in the ciliary ganglion of a chicken. A broad area of the cytoplasmic fracture face is exposed, showing clusters of gap junction particles (arrows). (C) Higher magnification of one such cluster. Each particle in the cluster represents a single connexon. (D) Gap junction region, showing individual connexons bridging the gap between the lipid membranes of two apposed cells. (A from Sotelo, Llinás, and Baker, 1974; B and C from Cantino and Mugnani, 1975; D after Makowski et al., 1977.)

дритам пирамидальных клеток, от тела клетки к поверхности коры со скоростью проведения около 3 м/с[26].

Дендритные потенциалы действия, обусловленные регенеративными натриевыми и кальциевыми токами, обнаружены во многих типах нервных клеток. В мозжечке клетки Пуркинье способны генерировать не только натриевые потенциалы действия в области сомы, но и кальциевые потенциалы действия в дендритах[27]. Как показано на рис. 7.7А, дендритный кальциевый потенциал действия успешно достигает тела клетки. Соматический потенциал действия, напротив, не распространяется по всему дендритному дереву, но пассивно проникает в него лишь на короткие дистанции.

Как и в клетках Пуркинье, в пирамидальных клетках коры наблюдаются натриевые потенциалы действия, обычно возникающие в начальных участках аксона. В удаленных дендритах этих клеток было показано наличие кальциевых потенциалов действия[28, 29]. Ответ пирамидальной клетки на деполяризацию, вызванную активацией возбуждающих синапсов (глава 9) на удаленных дендритах, показан на рис. 7.7В. Небольшая синаптическая активация (рис. 7.7В, а) вызывает деполяризацию дендритов, которая пассивно распространяется к соме. Эта деполяризация вызывает в соме потенциал действия, который распространяется обратно в дендрит. Более сильная синаптическая активация (рис. 7.7В, b) приводит к генерации собственного потенциала действия в дендрите, возникающего раньше соматического.

Несмотря на обширные данные о регенеративной активности в дендритах, общее представление об аксонном холмике как о наиболее возбудимой части клетки по-прежнему сохраняется[30].

Очевидно, что распространение потенциала действия в дендрите представляет собой гораздо более сложный процесс, чем в ак-

соне. Во-первых, в аксоне справедливо допущение, что подпороговые изменения потенциала не влияют на пассивные свойства мембраны. В дендритах, напротив, это допущение невозможно благодаря наличию целого ряда потенциалзависимых проводимостей, кроме тех, что обычно участвуют в генерации потенциала действия. Положение еще более усложняется тем, что в дендритном дереве потенциалы действия соседствуют с синаптическими потенциалами. Например, фактор надежности обратного распространения потенциала действия из сомы зависит от входного сопротивления различных ветвей; входное сопротивление, в свою очередь, зависит от степени активности возбуждающих и тормозных синапсов. Таким образом, обратное распространение возбуждения в дендриты зависит от синаптической активности[31)–33)]. В то же время поведение потенциалзависимых синаптических токов будет меняться в зависимости от обратного распространения возбуждения[34)]. Процесс понимания этих сложных процессов синаптической интеграции и обработки сигналов находится еше в самом начале.

§ 4. Токи, протекающие между клетками

В большинстве случаев электрический ток не может течь напрямую с одной клетки на другую. Существуют, однако, **электрически сопряженные** клетки. Свойства и функции электрических синапсов описаны в главе 9. Здесь речь пойдет об особых межклеточных структурах, обеспечивающих электрическую непрерывность между ними.

Структуры, обеспечивающие электрическое сопряжение: щелевые соединения

В местах электрического сопряжения межклеточный ток протекает через **щелевые соединения**[35)]. Щелевым соединением называется участок тесного контакта мембран двух клеток, в каждой из которых имеется скопление особых частиц, собранных в гексагональные структуры (рис. 7.8). Каждая частица, именуемая **коннексоном**, состоит из шести белковых субъединиц, образующих круг с внешним диаметром около 10 нм и внутренним диаметром 2 нм[36, 37)]. На сопряженной клетке находится точно такая же структура. Совместно они пронизывают зазор между мембранами (2–3 нм). Полость в сердцевине соединенных коннексонов способствует перемещению ионов и мелких молекул между клетками. Проводимость одиночного канала, образованного двумя сопряженными молекулами коннексона, составляет около 100 пСм[38)].

Целый ряд белковых субъединиц коннексона (коннексонов) массой 26–56 кД был изолирован и клонирован[36, 39)]. Названия соответствуют массе: например, коннексон-32 (32 кД) найден в печени крысы, коннексон-43 — в сердечной мышце, и т. д. Гидропатический анализ (глава 3) указывает на то, что коннексоны состоят из четырех спиральных сегментов, пронизывающих мембрану. Исследования с применением антител подтвердили, что N-конец и C-конец коннексонов расположены в цитоплазме. В каждом типе ткани в формировании коннексона участвует один или, возможно, всего несколько типов коннексонов, однако функциональное сопряжение возможно: например, когда иРНК для коннексона-32 инъецирована в одну из клеток, а для коннексона-42 — в другую, сопряженную с первой[40)]. Сформировать щелевое соединение можно искусственно, инъецировав иРНК в два соприкасающихся ооцита *Xenopus*[41)]. Важнейшим неразрешенным вопросом остается то, каким образом коннексоны на двух сопряженных клетках находят друг друга, а затем подстраивают свое положение друг под друга, не формируя при этом поры между цитоплазмой и внеклеточной средой.

Выводы

- Распространение местных подпороговых потенциалов в нейронах, а также продвижение потенциала действия вдоль нервного волокна, зависит от электрических свойств цитоплазмы и мембраны клетки.
- При инъекции постоянного тока в цилиндрическое волокно величина местного потенциала определяется входным сопротивлением волокна (r_{input}), а также расстоянием, на которое он может распространиться, определяемым постоянной длины (λ).

- Входное сопротивление и постоянная длины зависят, в свою очередь, от удельного сопротивления мембраны (R_m) и аксоплазмы (R_i), а также диаметра волокна.
- Кроме резисторных, мембрана облвдает емкостными свойствами. Емкость мембраны (C_m) проявляется в замедлении фаз роста и спада электрических сигналов. Величина этого эффекта определяется выражением: $\tau = R_m C_m$.
- Распространение потенциала действия вдоль волокна зависит от пассивного перемещения тока от активного участка мембраны к соседнему. Скорость проведения зависит от постоянной времени и постоянной длины мембраны.
- Крупные нервные волокна позвоночных завернуты в миелиновую оболочку, выработанную шванновскими клетками. Оболочка прерывается через равные промежутки, образуя перехваты Ранвье. Во время прохождения возбуждения потенциал действия «перескакивает» с одного перехвата на другой (явление сальтаторного проведения).
- Распространение потенциала действия сильно зависит от геометрических факторов, связанных с изменением площади поверхности мембраны. Распространение может быть прерванным в точках ветвления нервного окончания, и перемещение возбуждения в разветвленных дендритах может иметь предпочтительные направления.
- Перенос электрического заряда с одной клетки на другую происходит в местах межклеточных контактов, обладающих низким сопротивлением и называемых щелевыми соединениями. Эти соединения образованы скоплениями коннексонов, белковых молекул, способных формировать водные поры между цитоплазмами смежных клеток.

Рекомендуемая литература

- Arbuthnott, E. R., Boyd, I. A., and Kalu, K. U. 1980. Ultrastructural dimensions of myelinated peripheral nerve fibres in the cat and their relation to conduction velocity. *J. Physiol.* 308: 125–157.
- Goodenough, D. A., Goliger, J. A., and Paul, D. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 475–502.
- Perkins, G., Goodenough, D., and Sosinsky, G. 1997. Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophys. J.* 72: 533–544.
- Rushton, W. A. H. 1951. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J. Physiol.* 115: 101–122.
- Vabnick, I., and Shrager, P. 1998. Ion channel redistribution and function during development of the myelinated axon. *J. Neurobiol.* 37: 80–96.

Цитированная литература

1. Rall, W. 1967. *J. Neurophysiol.* 30: 1138–1168.
2. Lev-Tov, A., et al. 1983. *J. Neurophysiol.* 50: 399–412.
3. Hodgkin, A. L., and Rushton, W. A. H. 1946. *Proc. R. Soc. Lond. B* 133: 444–479.
4. Hodgkin, A. L. 1954. *J. Physiol.* 125: 221–224.
5. Arbuthnott, E. R., Boyd, I. A., and Kalu, K. U. 1980. *J. Physiol.* 308: 125–157.
6. Tasaki, I. 1959. *In Handbook of Physiology*, Section 1, Vol. 1, Chapter 3. American Physiological Society, Bethesda, MD, pp. 75–121.
7. Huxley, A. F., and Stampfli, R. 1949. *J. Physiol.* 108: 315–339.
8. Bostock, H., and Sears, T. A. 1978. *J. Physiol.* 280: 273–301.
9. Xu, K., and Terakawa, S. 1999. *J. Exp. Biol.* 202: 1979–1989.
10. Gasser, H. S., and Erlanger, J. 1927. *Am. J. Physiol.* 80: 522–547.
11. Rushton, W. A. H. 1951. *J. Physiol.* 115: 101–122.
12. Arbuthnott, E. R., Boyd, I. A., and Kalu, K. U. 1980. *J. Physiol.* 308: 125–157.
13. Vabnick, I., and Shrager, P. 1998. *J. Neurobiol.* 37: 80–96.
14. Chiu, S. Y., and Ritchie, J. M. 1981. *J. Physiol.* 313: 415–437.
15. Wang, H., et al. 1993. *Nature* 365: 75–79.
16. Rasband, M. N., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 36–47.
17. Koh, D. S., Jonas, P., and Vogel, W. 1994. *J. Physiol.* 479 (Pt. 2): 183–197.
18. England, J. D., Levinson, S. R., and Shrager, P. 1996. *Microsc. Res. Tech.* 34: 445–451.
19. Bostock, H., Sears, T. A., and Sherratt, R. M. 1981. *J. Physiol.* 313: 301–315.

20. Yau, K. W. 1976. *J. Physiol.* 263: 513–538.
21. Gu, X. N., Macagno, E. R., and Muller, K. J. 1989. *J. Neurobiol.* 20: 422–434.
22. Baccus, S. A. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8345–8350.
23. Quick, D. C., Kennedy, W. R., and Donaldson, L. 1979. *Neuroscience* 4: 1089–1096.
24. Coombs, J. S., Eccles, J. C., and Fatt, P. 1955. *J. Physiol.* 130: 291–325.
25. Kuffler, S. W., and Eyzaguirre, C. 1955. *J. Gen. Physiol.* 39: 87–119.
26. Li, C–L., and Jasper, H. H. 1953. *J. Physiol.* 121: 117–140.
27. Llinás, R., and Sugimori, M. 1980. *J. Physiol.* 305: 197–213.
28. Stuart, G., Schiller, J., and Sakmann, B. 1997. *J. Physiol.* 505: 617–632.
29. Svoboda, K., et al. 1999. *Nat. Neurosci.* 2: 65–73.
30. Stuart, G., et al. 1997. *Trends Neurosci.* 20: 125–131.
31. Tsubokawa, H., and Ross, W. N. 1996. *J. Neurophysiol.* 76: 2896–2906.
32. Sandler, V. M., and Ross, W. N. 1999. *J. Neurophysiol.* 81: 216–224.
33. Larkum, M. E., Zhu, J. J., and Sakmann, B. 1999. *Nature* 398: 338–341
34. Markram, H., et al. 1997. *Science* 275: 213–215.
35. Loewenstein, W. 1981. *Physiol. Rev.* 61: 829–913.
36. Goodenough, D. A., Goliger, J. A., and Paul, D. 1996. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 475–502.
37. Perkins, G., Goodenough, D., and Sosinsky, G. 1997. *Biophys. J.* 72: 533–544.
38. Neyton, J., and Trautmann, A. 1985. *Nature* 317: 331–335.
39. Larsen, W. J., and Veenstra, R. D. 1998. In *Cell Physiology Source Book*, 2nd Ed. Academic Press, New York, pp. 467–480.
40. Swensen, K. I., et al. 1989. *Cell* 57: 145–155.
41. Werner, R., et al. 1985. *J. Membr. Biol.* 87: 253–268.

Глава 8

Свойства и функции нейроглиальных клеток

Нервные клетки в центральной и периферической нервной системе окружены клетками-спутниками: шванновскими клетками на периферии и нейроглиальными клетками в ЦНС. В этой главе будут обсуждаться вопросы — как устроены клетки-спутники, как они взаимодействуют с нейронами и какова их физиологическая роль.

Нейроглиальные клетки составляют около половины объема мозга, а их количество значительно превышает количество нейронов. Основными классами нейроглиальных клеток являются олигодендроциты, астроциты и радиальные глиальные клетки. Микроглиальные клетки представляют собой особую популяцию клеток-фагоцитов нервной системы. Нейроны и глиальные клетки очень плотно упакованы. Их мембраны отделены друг от друга узким экстраклеточным пространством шириной около 20 нм, заполненным жидкостью. Мембраны глиальных клеток — так же как и мембраны нейронов — содержат ионные каналы, рецепторы нейромедиаторов, насосы, транспортирующие ионы, и транспортеры аминокислот. Вдобавок, глиальные клетки связаны друг с другом щелевыми контактами, через которые могут проходить ионы и небольшие молекулы. Глиальные клетки имеют более отрицательный, чем нейроны, потенциал покоя, но не способны генерировать потенциалы действия.

Основной ролью олигодендроцитов и шванновских клеток является формирование миелина вокруг аксонов, что значительно ускоряет проведение нервных импульсов. Глиальные и шванновские клетки также являются проводниками растущих аксонов к их мишеням. Микроглиальные клетки появляются в участках повреждения или воспаления и фагоцитируют продукты распада.

В силу близкого расположения мембран глиальных клеток и нейронов, между этими двумя типами клеток существует динамическое взаимодействие. Так, нейроны освобождают K^+ в узкое внеклеточное пространство по время проведения нервных импульсов, что приводит к увеличению концентрации внеклеточного K^+ и деполяризации глиальных клеток. Глиальные клетки влияют на состав жидкости, которая окружает нейроны, захватывая K^+, а также нейропередатчики, которые накапливаются в результате нервной активности. Глиальные клетки секретируют передатчики, питательные вещества и трофические факторы во внеклеточное пространство. Довольно сложно оценить количественно, каков вклад этих механизмов в нормальное функционирование нейронов.

Нервные клетки в мозге очень плотно окружены клетками-спутниками, которые называются **глиальными клетками**, или **глией**. Было подсчитано, что количество глиальных клеток превышает количество нейронов по крайней мере в 10 раз, и глия составляет около половины объема нервной системы. С момента их открытия функция глиальных клеток длительное время оставалась загадкой для нейробиологов. Несмотря на то, что количество глиальных клеток заметно больше, физиологическая активность нервной системы часто обсуждается исключительно в рамках функционирования нейронов, как если бы глия не существовала. В настоящей главе обсуждаются физиологические свойства глиальных клеток и их функциональное взаимодействие с нейронами.

Исторический ракурс

Глиальные клетки были впервые описаны в 1846 году Рудольфом Вирховым, который считал, что они являются «нервным клеем» — отсюда они и получили свое название (glue по английски означает клей). Выдержки из работы Вирхова дают возможность почувствовать эту точку зрения[1]:

До сих пор, описывая нервную систему, я говорил только об истинно нейрональной ее

части. Однако... важно знать о той субстанции... которая находится между собственно нейрональными частями, скрепляет их вместе и создает целостную форму... это подталкнуло меня к тому, чтобы дать ей свое название — нейроглия. ...Опыты показывают нам, что эта ткань головного и спинного мозга является одним из наиболее частых мест посмертных изменений... В нейроглии проходят сосуды, которые практически повсеместно отделены от нервной субстанции промежуточным слоем и не входят с ней в непосредственный контакт.

В последующие годы нейроглиальные клетки интенсивно исследовались нейроанатомами и патологами, которым они были известны как наиболее частый источник опухолей в мозге. Это не так уж и удивительно, поскольку определенные глиальные клетки — в отличие от большинства нейронов — могут продолжать делиться и размножаться во взрослом живом организме. Среди самых первых предположений о роли глиальных клеток по отношению к нейронам были структурная поддержка, секреция трофических факторов и электрическая изоляция нейронов[2)]. Питательная роль нейроглии была предположена Гольджи в 1883 году[3)]. Он писал:

Нейроглия... служит для доставки питательных веществ... (и)... отличается от обычной соединительной ткани своими морфологическими и химическими характеристиками и иным эмбриологическим происхождением.

Идеи Гольджи казались настолько правильными и имели такую силу, что на протяжении многих лет никому и в голову не приходило их проверить.

Морфология и классификация глиальных клеток

Отличительным от нейронов свойством нейроглиальных клеток является отсутствие аксонов. Типичная глиальная клетка изображена на рис. 8.1. В ЦНС позвоночных глиальные клетки подразделяются на несколько классов[4, 5)].

Астроциты контактируют с капиллярами и нейронами. Они делятся на две основные группы: (1) фиброзные астроциты, которые содержат филаменты; эти клетки в большом количестве находятся в пучках миелинизированных нервных волокон в белом веществе мозга; (2) протоплазматические астроциты, которые содержат меньше фиброзного материала и изобилуют в сером веществе, возле сомы и дендритов нейронов и синапсов.

Олигодендроциты в основном находятся в белом веществе, где они формируют миелин вокруг крупных аксонов (глава 7).

Радиальные глиальные клетки играют важную роль в развитии ЦНС млекопитающих. Они натянуты как струны через всю толщину спинного мозга, сетчатки, мозжечка к их поверхности, образуя продолговатые филаменты, вдоль которых развивающиеся нейроны мигрируют к своему месту назначения. В ЦНС взрослых животных присутствуют клетки, напоминающие радиальную глию — клетки Бергмана в мозжечке и мюллеровские клетки в сетчатке.

Эпендимиальные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность мозга — желудочков, — также классифицируются как глиальные клетки.

Микроглиальные клетки отличаются от нейроглиальных клеток по структуре, свойствам и происхождению[6, 7)]. Они напоминают макрофаги крови и, по всей видимости, от них и происходят.

В периферических нервах и ганглиях позвоночных **шванновские клетки** являются аналогом глиальных клеток. Они формируют миелин вокруг быстро проводящих аксонов. Шванновские клетки плотно облегают также маленькие аксоны (менее 1 микрометра в диаметре), не формируя при этом миелинового слоя.

Определение **клеток-сателлитов**, или спутников, употребляется в настоящей главе для обозначения всех не нейрональных клеток в совокупности, включая глиальные клетки в ЦНС и шванновские клетки на периферии.

Различные типы глиальных клеток могут быть определены путем введения меток, например, специальных красок в живых препаратах, или с помощью иммунологических приемов (рис. 8.2). Существуют антитела, которые специфически связываются с астроцитами, олигодендроцитамии, микроглией, шванновскими клетками[8)]. Например, фиброзные астроциты могут быть покрашены с помощью антител к белку GFAP[9)] (glial fibrillary acidic protein; рис. 8.2Б).

Как и нейроны в центральной и периферической нервной системах, глиальные и шванновские клетки имеют различное эмбриональное происхождение: глиальные клетки в ЦНС происходят из клеток предшественников, выстилающих нервную трубку, которая представляет собой внутреннюю поверхность мозга. Шванновские клетки происхо-

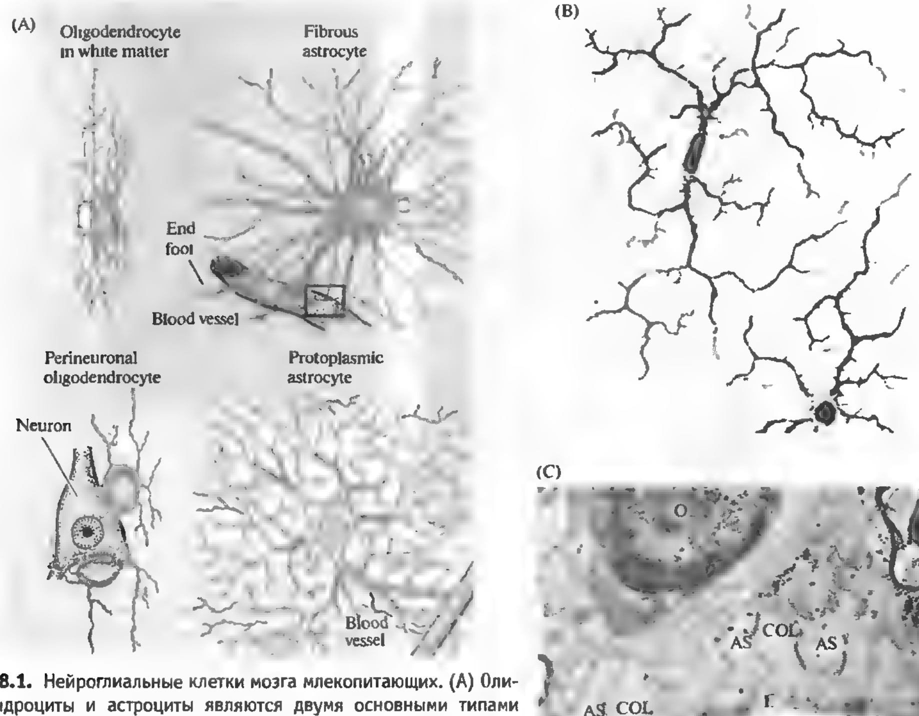


Рис. 8.1. Нейроглиальные клетки мозга млекопитающих. (A) Олигодендроциты и астроциты являются двумя основными типами нейроглиальных клеток в мозге позвоночных. (B) Микроглиальные клетки имеют маленькие размеры и напоминают макрофаги. (C) Электронная микрофотография глиальных клеток в оптическом тракте крысы. На нижней части виден просвет капилляра (CAP), который выстлан эндотелиальными клетками (E). Капилляр окружен отростками фиброзных астроцитов (AS). Пространство между отростками астроцитов и эндотелиальными клетками заполнено коллагеновыми волокнами (COL). На верхней части видна часть ядра олигодендроцита (OL), а справа видны аксоны, покрытые миелиновой оболочкой.

Fig. 8.1. Neuroglial Cells in Mammalian Brain. (A) Oligodendrocytes and astrocytes, stained with silver impregnation, represent the principal types of neuroglial cells in vertebrate brain. They are closely associated with neurons. (B) Microglial cells are small, wandering, macrophage-like cells. (C) Electron micrograph of glial cells in rat optic nerve. In the lower portion is the lumen of a capillary (CAP) lined with endothelial cells (E). The capillary is surrounded by end feet formed by processes of fibrous astrocytes (AS). Between the end feet and the endothelial cells is a space filled with collagen fibers (COL). In the upper portion is part of a nucleus of an oligodendrocyte (OL), and to the right are axons surrounded by myelin wrapping. (A and B after Penfield, 1932, and Del Rio-Hortega, 1920; C from Peters, Palay, and Webster, 1991.)

дят из нервного гребня (глава 23). У некоторых животных, как, например, у пиявки, развитие глиальных клеток можно наблюдать непосредственно[10]. Клетки-предшественники дифференцируются в глиальные клетки, которые окружают тела и дендриты нейронов, а также синапсы. Развитие глиальных клеток может быть исследовано в эмбрионах позвоночных путем окраски клеток-предшественников. Небольшое количество клеток инфицируется на ранних этапах развития вирусом, содержащим ген-маркер, который передается от поколения к поколению[11]. Помеченные клетки могут быть впоследствии идентифицированы как астроциты или олигодендроциты. Таким образом можно прослеживать клеточные линии и определять этапы развития, на которых глиальные клетки дивергируют от нейронов.

Структурные связи между нейронами и глией

При взгляде на электронную микрофотографию мозга бросается в глаза то, как плотно

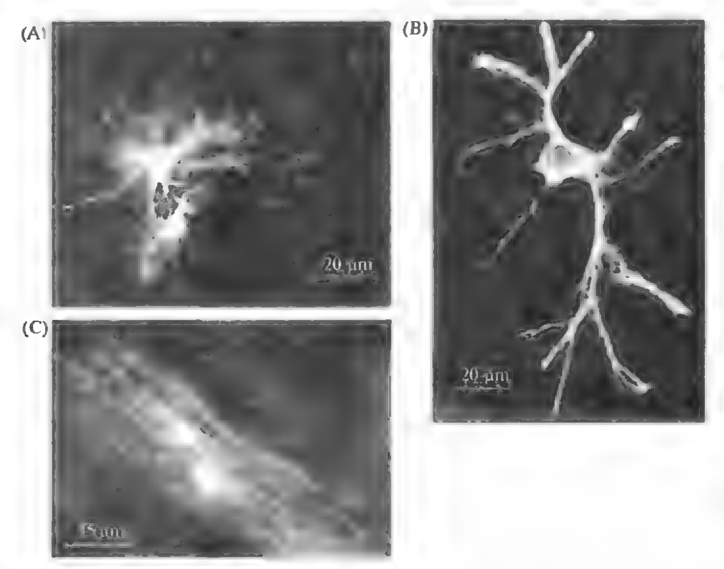


Рис. 8.2. Глиальные клетки, окрашенные при помощи внутриклеточной инъекции красителя и антителами. (A) В астроцит оптического нерва крысы был введен путем внутриклеточной инъекции флуоресцентный краситель Lucifer Yellow. Через щелевые контакты краситель проник также в соседний астроцит, в результате чего окрашенными оказались два нейрона. (B) Фиброзный астроцит, свежевыделенный из оптического нерва саламандры, окрашен антителами к глиальному протеину GFAP. (C) Олигодендроциты в оптическом нерве крысы, заполненные Lucifer Yellow. Расположенные параллельно продольные отростки являются характерным свойством олигодендроцитов.

Fig. 8.2. Glial Cells Labeled by Intracellular Injection and Antibodies. (A) Dye coupling of astrocytes in intact rat optic nerve. An astrocyte was filled with Lucifer yellow by intracellular injection. The dye spread to a neighboring astrocyte. (B) Fibrous astrocyte, freshly dissociated from salamander optic nerve, labeled by an antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP). The antibody staining and the shape unequivocally establish its identity. (C) Oligodendrocytes in rat optic nerve filled with Lucifer yellow by intracellular injection. The appearance of the longitudinal processes that run symmetrically in parallel is characteristic for oligodendrocytes. (A and C after Butt and Ransom, 1993, photos kindly provided by A. M. Butt; B from Newman, 1986.)

упакованы нейроны и глия. На рис. 8.3 показан срез мозжечка крысы. На срезе множество нейронов и глиальных клеток, которые можно различить по множеству критериев. Глиальные отростки обычно тонкие, иногда тоньше 1 микрометра. Лишь вокруг ядра глиальных клеток можно обнаружить значительное количество цитоплазмы. Экстраклеточное пространство ограничено узкими щелями (около 20 нм). Никаких специальных контактов между нейронами и глией во взрослой ЦНС не наблюдается, и физиологические тесты не обнаруживают прямых связей между ними. Однако, между собой глиальные клетки связаны плотными (щелевыми) контактами (gap junctions) (глава 7)[12, 13]. Взаимоотношения между глиальными клетками, нейронами, капиллярами и экстраклеточным пространством схематично изображены на рис. 8.4.

§ 1. Физиологические свойства клеточных мембран глиальных клеток

Мембраны глиальных клеток были впервые исследованы в ЦНС пиявки. Глиальные клетки в ганглии пиявки имеют большие размеры и прозрачны (см. рис. 15.2). Под микроскопом они выглядят как пустое пространство между нейронами, и их можно исследовать с помощью внутриклеточных или пэтч-кламп электродов[12, 14, 15]. После регистрации физиологических свойств глиальную клетку можно заполнить флуоресцентным маркером (например, люцифером желтым, Lucifer Yellow) и наблюдать ее форму в живом препарате. После того, как были описаны глиальные клетки пиявки, были описаны также свойства и морфология глиальных клеток земно-

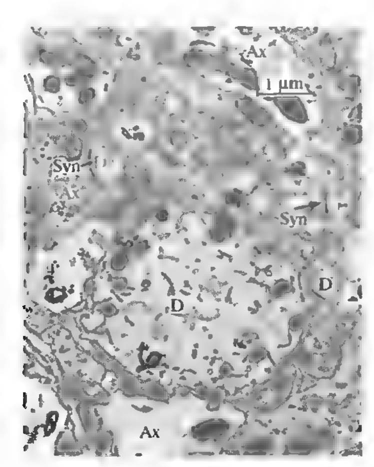


Рис. 8.3. Нейроны и отростки глиальных клеток мозжечка крысы. Глиальные клетки слегка окрашены. Нейроны и глиальные клетки разделены щелью шириной около 20 нм. Нейрональные элементы: дендриты (Д) и аксоны (Ах). Два синапса (Syn) отмечены стрелками.

Fig. 8.3. Neurons and Glial Processes in Rat Cerebellum. The glial contribution is lightly colored. The neurons and glial cells are always separated by clefts about 20 nm wide. The neural elements are dendrites (D) and axons (Ax). Two synapses (Syn) are marked by arrows. (After Peters, Palay, and Webster, 1991.)

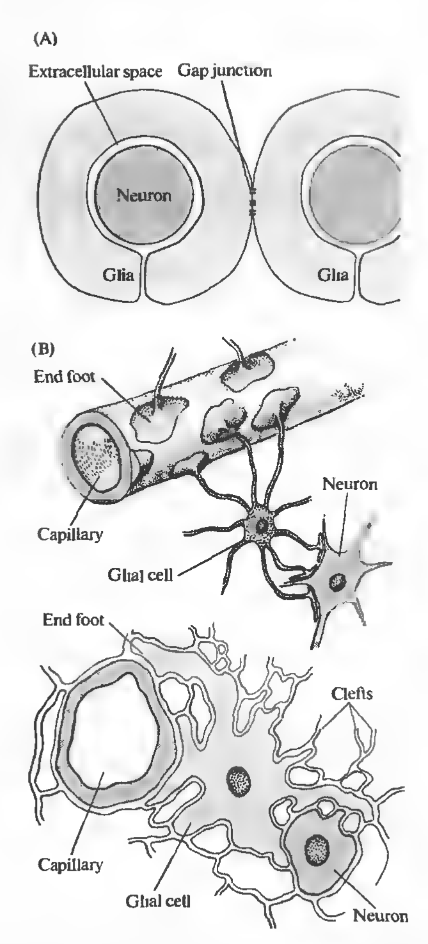


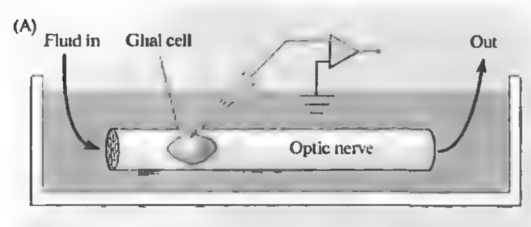
Рис. 8.4. Нейроны, глия, внеклеточное пространство и кровь. (А) Нейронально-глиальные и глиально-глиальные взаимодействия. В то время как нейроны и глиальные клетки всегда разделены щелью, глиальные клетки соединены щелевыми контактами (gap junctions). (В) Связи между капиллярами, глией и нейронами в световом и электронном микроскопе. Пути диффузии из капилляров к нейронам проходят через заполненное жидкостью пространство межклеточных щелей. Пропорции клеточных размеров несколько изменены.

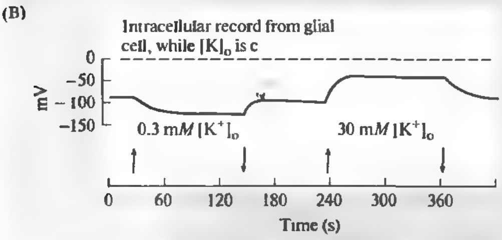
Fig. 8.4. Neurons, Glia, Extracellular Space, and Blood. (A) Neuronal–glial and glial–glial relationships. While neurons are always separated from glia by continuous clefts, the interiors of glial cells are linked by gap junctions. (B) Relations of capillaries, glia, and neurons as seen by light and electron microscopy. The pathway for diffusion from the capillary to the neuron is through the aqueous intercellular clefts. Cell dimensions are not in proportion. (After Kuffler and Nicholls, 1966.)

водных и млекопитающих, и обнаружилось значительное сходство между ними[16].

Потенциал покоя глиальных клеток больше (более отрицательный внутри), чем у нейронов. Самые большие значения мембранного потенциала в нейронах не превышают −75 мВ, в то время как у глиальных клеток мембранный потенциал может достигать −90 мВ. Другим отличительным свойством глиальных клеток является отсутствие распространяющихся потенциалов действия. Лишь в нескольких исследованиях было показано, что глиальные клетки в культуральных условиях способны генерировать регенеративные ответы.

Мембрана глиальной клетки ведет себя как калиевый электрод, т. е. в соответствии с уравнением Нернста для растворов с различными концентрациями ионов калия (глава 5). Другие ионы вносят весьма незначительный вклад в мембранный потенциал[17]. На рис. 8.5 показана зависимость мембранного потенциала глиальной клетки от наружной концентрации ионов калия $[K]_o$ в логарифмической шкале. Прямая линия — теоретическая зависимость мембранного потенциала с наклоном 59 мВ при 10-кратном изменении концен-





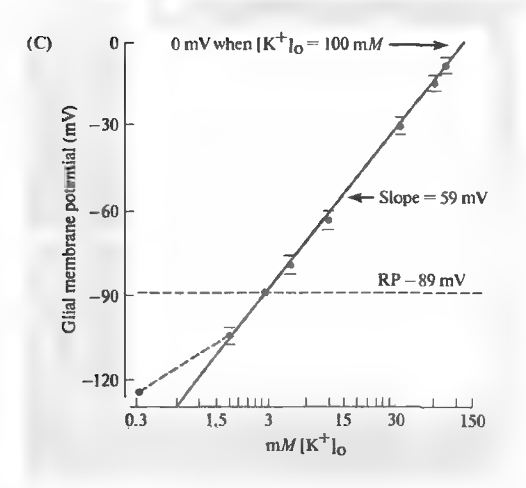


Рис. 8.5. Зависимость мембранного потенциала глиальной клетки от наружной концентрации ионов калия. (A) Схема внутриклеточной регистрации от глиальной клетки. (B) Уменьшение концентрации калия с физиологического уровня (3 ммоль) до 0,3 ммоль вызывает гиперполяризацию мембраны; увеличение внеклеточной концентрации калия до 30 ммоль приводит к деполяризации на 59 мВ. (C) Зависимость между мембранным потенциалом и внеклеточной концентрацией калия, рассчитанная по уравнению Нернста (сплошная линия), точно соответствует экспериментальным данным, за исключением очень низких концентраций калия. Нейроны менее чувствительны к небольшим изменениям концентрации калия в физиологическом диапазоне. RP — потенциал покоя.

Fig. 8.5. Dependence of Glial Membrane Potential on potassium concentration. (A) System for recording from a glial cell in mud puppy optic nerve while changing external potassium concentration. (B) Reducing the potassium concentration from the normal 3,0 m*M* to 0,3 m*M* hyperpolarizes the membrane; increasing the potassium concentration to 30 m*M* depolarizes by 59 mV. (C) The relation between potassium concentration and membrane potential predicted by the Nernst equation (solid line) accurately fits the experimental results, except at very low extracellular potassium concentrations. Neurons are less sensitive than glia to small changes in potassium concentration in the physiological range. RP = resting potential. (After Kuffler, Nicholls, and Orkand, 1966.)

трации в соответствии с уравнением Нернста (при 24° С). Эта зависимость значительно отличается от большинства нейронов, мембранный потенциал которых не соответствует рассчитанному по уравнению Нернста в диапазоне физиологических концентраций $[K]_o$ от 2 до 4 ммоль (глава 5).

Распределение калиевых каналов было исследовано на мембране мюллеровских глиальных клеток и астроцитов, изолированных из сетчатки и оптического нерва различных животных: лягушки[18], саламандры[19] и кролика[20]. Чувствительность к калию максимальна на конце отростка мюллеровской клетки и сравнительно мала на теле. Изолированная мюллеровская клетка саламандры и ответы на аппликацию высокой концентрации калия на ее различные участки показаны на рис. 8.6. На ранних этапах развития калиевые каналы расположены по поверхности мюллеровской клетки более однородно, а повышенная чувствительность к высокому калию на конце ножки появляется только после трансформации головастиков во взрослых лягушек[18]. Возможное физиологическое значение этого явления обсуждается ниже в этой главе.

Ионные каналы, транспортеры и рецепторы в мембранах глиальных клеток

На мембране глиальных и шванновских клеток, выращиваемых в культуральных услови-

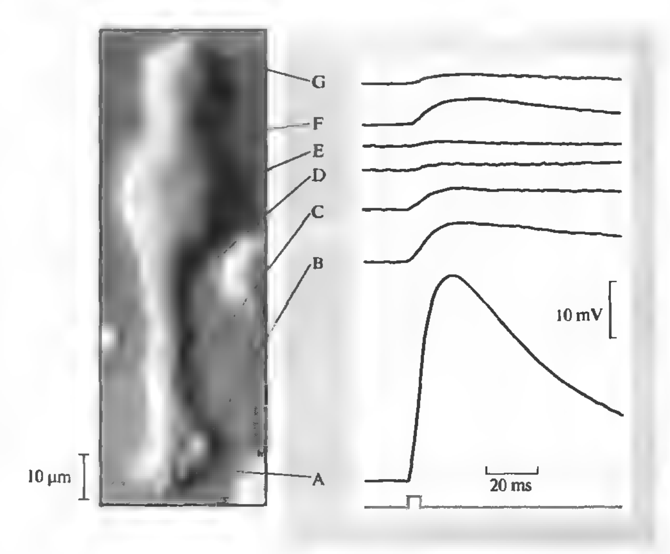


Рис. 8.6. Ответы на повышение внеклеточного калия в мюллеровских глиальных клетках, изолированных из сетчатки саламандры. Ответы на аппликацию раствора с повышенной концентрацией калия на различные участки клетки регистрировались с помощью внутриклеточного электрода. A — концевая ножка мюллеровской клетки, а G — ее дистальная часть. Чувствительность к калию самая большая на концевой ножке, что предполагает более высокую концентрацию калиевых каналов в этом участке клетки.

Fig. 8.6. Responses to Potassium of a Müller Glial Cell isolated from salamander retina. Recordings were made with an intracellular electrode while potassium was applied to different sites. A is the end foot, and G is the distal part of the cell. The sensitivity to potassium is much greater at the end foot, suggesting a higher concentration of potassium channels in that region. (After Newman, 1987; micrograph kindly provided by E. Newman.)

ях, обнаруживаются разнообразные ионные каналы и транспортеры:

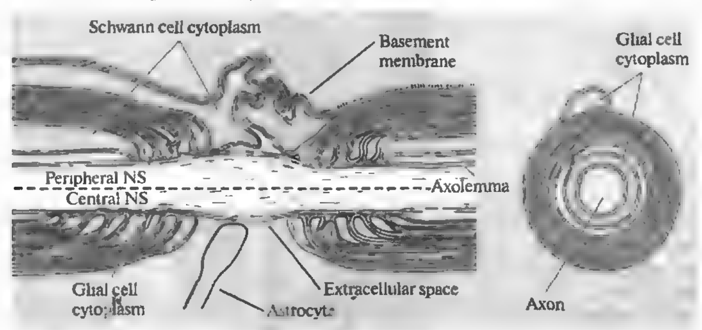
1. При этом, как уже было отмечено выше, доминируют калиевые проводимости[16].
2. На мембранах шванновских клеток и астроцитов есть потенциалзависимые натриевые и кальциевые каналы[21]. Общее соотношение проводимости мембраны мюллеровских клеток к калию и натрию оценивается приблизительно как 100 : 1. Как уже было отмечено выше, активация натриевых и кальциевых каналов не приводит к генерации потенциала действия.
3. Исследование с помощью пэтч-кламп регистрации обнаружило хлорные каналы в шванновских клетках и астроцитах[22].
4. В глиальных клетках присутствуют ионные помпы для транспорта натрия и калия, а также бикарбоната и протонов[23].
5. На мембранах глиальных клеток в большом количестве экспрессированы транспортеры глутамата, ГАМК и глицина; они захватывают нейромедиаторы, выделяемые нейронами[24].
6. Олигодендроциты, астроциты и шванновские клетки имеют многочисленные рецепторы к нейромедиаторам[25].

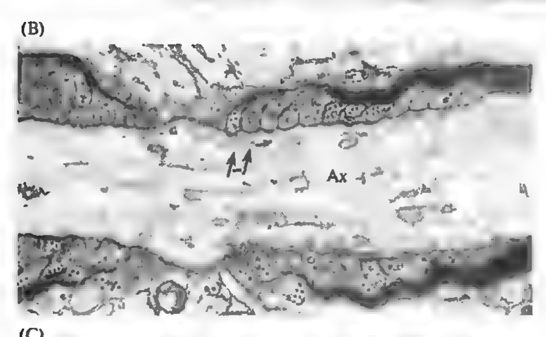
Электрические контакты между глиальными клетками

Соседние глиальные клетки соединены друг с другом посредством щелевых контактов (глава 7). Этим они напоминают эпителиальные клетки, а также гладкомышечные клетки. Глиальные клетки обмениваются ионами и маленькими молекулами напрямую, минуя внеклеточное пространство, и такие связи могут использоваться для уменьшения концентрационных градиентов[26)—28]. Как отмечалось выше, щелевых контактов между нейронами и глиальными клетками не обнаруживается, и ионные токи через мембраны нейронов не влияют напрямую на близлежащие глиальные клетки.

§ 2. Функции глиальных клеток

На протяжение многих лет практически каждая функция клеток в нервной системе, которая не находила очевидного объяснения, причислялась к функции глиальных клеток. В последующих разделах мы вначале рассмотрим те функции глиальных клеток, которые хорошо установлены, а затем перейдем к вопросам о тех функциях, которые требуют дальнейших исследований.





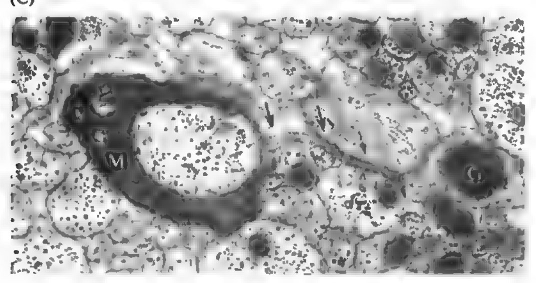


Рис. 8.7. Миелин и перехваты Ранвье. Олигодендроциты и шванновские клетки формируют миелиновую оболочку вокруг аксонов. (A) В перехватах Ранвье (слева) миелиновая оболочка прерывается. Справа изображен поперечный срез через аксон, покрытый миелиновой оболочкой. (B) Электронная микрофотография области перехвата Ранвье миелинизированного волокна ЦНС крысы. На краю перехвата мембрана аксона (Ax) и складки миелиновой оболочки (отмечены стрелками) плотно прилегают друг к другу. (C) Поперечный срез миелинизированного аксона в области перехвата; отросток астроцита (G), который контактирует с аксоном, отмечен стрелками. Миелин (M) отсутствует в месте контакта между астроцитом и перехватом.

Fig. 8.7. Myelin and Nodes of Ranvier. Oligodendrocytes and Schwann cells form the wrapping of myelin around axons. (A) At the nodes of Ranvier, like the one shown here on the left, the myelin is interrupted and the axon is exposed. The upper half of the nodal region, with a loose covering of processes, is typical of the arrangement in peripheral nerves. The lower part is representative of a node within the central nervous system. Here an astrocytic finger comes into close apposition with the nodal membrane. To the right is a transverse section through a myelin-covered axon. (B) Electron micrograph of a nodal region in a myelinated fiber in rat CNS. At the edge of the node is a specialized close contact area between the membrane of the axon (Ax) and the membrane of the myelin wrapping (arrows). (C) Cross section of a myelinated axon at a node that is contacted by a process (marked with arrows) from a perinodal astrocytic glial cell (G). Myelin (M) is absent at the site of contact between the astrocyte and the node. (A after Bunge, 1968; B from Peters, Palay, and Webster, 1991; C from Sims et al., 1985; micrograph kindly provided by J. Black and S. Waxman.)

Миелин и роль глиальных клеток в проведении возбуждения по аксонам

Важной функцией олигодендроцитов и шванновских клеток является формирование вокруг аксонов миелиновой оболочки — слоя с высоким сопротивлением, который подобен изолирующей оболочке электрического провода (глава 7). Миелиновая оболочка прерывается в перехватах Ранвье (рис. 8.7), которые расположены вдоль аксона через равные интервалы[29]. Характерной особенностью перехватов в ЦНС являются отростки астроцитов, которые контактируют с аксоном[30]. Поскольку ионные токи, возникающие при проведении потенциала действия, не могут проходить через миелин, ионы перемещаются только в местах перехватов. В результате скорость проведения по аксону значительно возрастает.

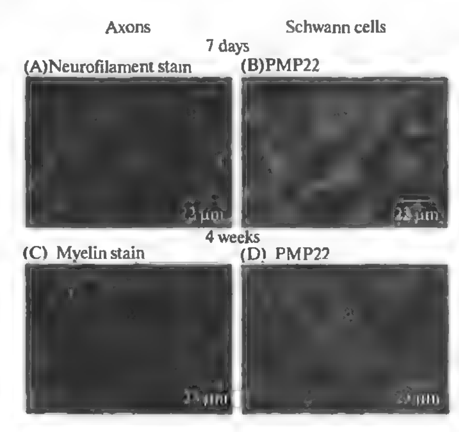


Рис. 8.8. Локализация миелинового протеина PMP22 в молодых и старых культурах аксонов и шванновских клеток. Возрастные изменения в распределении миелинового протеина PMP22 при совместном культивировании аксонов со шванновскими клетками. (A, B) Недельная культура нейронов (A) и шванновских клеток (B), окрашенных моноклональными антителами к нейрофиламентам и поликлональной сывороткой к PMP22. Стрелками указаны шванновские клетки, контактирующие с нейрональными отростками. На этом раннем этапе развития распределение глиальных и нейрональных белков значительно различается, и PMP22 в основном находится в теле шванновских клеток. (C, D) Через 4 недели культивирования PMP22 перераспределяется в миелиновые сегменты. Стрелками обозначены аксоны (C) и тела шванновских клеток (D).

Fig. 8.8. Localization of Myelin Protein (PMP22) in short- and long-term myelinating cultures of axons and Schwann cells. Changes in distribution of myelin protein PMP22 induced by coculture of axons with Schwann cells. (A, B) 1-week-old coculture of neurons (A) and Schwann cells (B) doubly stained with monoclonal antineurofilament and polyclonal PMP22 antiserum. Arrows point to Schwann cells that are in contact with neuronal processes. At this early stage the glial and neuronal proteins have different distributions, with PMP22 mainly in Schwann cell bodies. (C, D) After 4 weeks in medium that promotes myelination, PMP22 becomes colocalized with myelin segments (stained by antibody P0). Arrows point to axons (C) and to the cell bodies of elongated Schwann cells (D), with uniform PMP22 staining over the cell membrane. (After Pareek et al., 1997; photos kindly provided by E. Shooter.)

Несколько интересных вопросов возникает относительно связи шванновских клеток и олигодендроцитов с аксонами при формировании миелина. Например, какие генетические и внешние факторы позволяют глиальным клеткам выбирать подходящие аксоны, окружить их в надлежащее время и поддерживать миелиновую оболочку? Каковы характеристики нейрологических нарушений миелина, вызванных заболеванием или генетическими нарушениями? Формирование миелиновой оболочки в процессе развития происходит в результате комплексных и точных взаимодействий между нейронами и глиальными клетками. Расстояние между перехватами, зазор между глиальной клеткой и нейроном в участках, прилегающих к перехватам, распределение натриевых и калиевых каналов регулируется таким образом, чтобы обеспечить быстрое проведение импульса по аксону.

Динамическое взаимодействие между нейронами и шванновскими клетками было исследовано в культуральных условиях, при которых воспроизводятся как развитие самих шванновских клеток, так и процессы миелинизации и ремиелинизации аксонов[31]. Ключевые белки, участвующие во взаимодействии между шванновскими клетками и аксоном, идентифицированы[9]. Например, Шуутер и его коллеги показали, что когда шванновские клетки выращиваются в культуральных условиях сами по себе, то они синтезируют белок периферического миелина (известный как PMP22). В этих условиях оборот PMP22 очень быстр, и он подвергается деградации в эндоплазматическом ретикулуме. Если к этой культуре добавить нейроны (рис. 8.8), то сразу после контакта между нейроном и шванновской клеткой PMP22 перемещается в мембрану шванновской клетки. Это является важным этапом в формировании миелина. Вместе с тем, механизм сигнализации между нейронами и шванновскими клетками пока неизвестен[32, 33].

Точное количество производимого PMP22 является критическим для надлежащей миелинизации; избыточное или недостаточное производство PMP22 является причиной некоторых заболеваний. На рис. 8.9 показано, что замена всего одной аминокислоты в PMP22 (например, лейцина на пролин) приводит у мышей к заболеванию ("trembler"), которое характеризуется дефицитом миелинизации и серьезными неврологическими проблемами. Такая же мутация ответственна за наследственную нейропатию у человека.

Глиальные клетки также алияют на образование кластеров натриевых каналов в миелинизированных нервных волокнах. При миелинизации, димиелинизации и ремиелинизации изменяется распределение ионных ка-

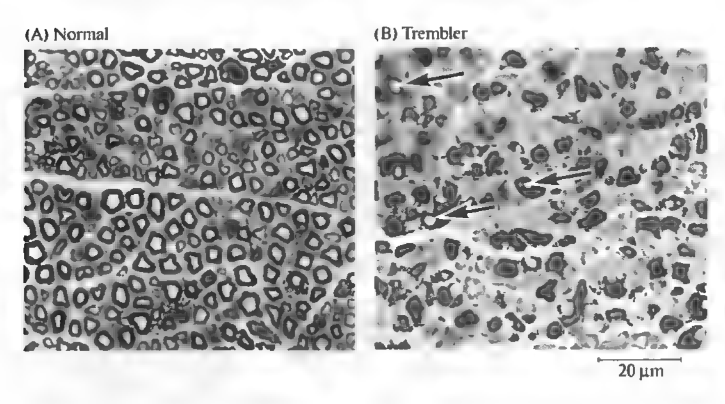


Рис. 8.9. Нарушение миелинизации у мутантной «трясущейся» мыши с генетическим дефектом миелинового белка PMP22. Седалищный нерв в контроле (А) и у «трясущейся» мыши (В). Обращают на себя внимание значительные различия в калибре аксонов и толщине миелиновой оболочки (отмечены стрелками на В). Точечная мутация, приводящая к замене всего одной аминокислоты (лейцина на пролин), вызывает нейропатию у мыши и у человека.

Fig. 8.9. Deficient Myelination in "Trembler" Mutant Mice with a genetic defect in a myelin protein, PMP22. Morphological appearance of sciatic nerves in normal (A) and mutant trembler (B) mice, aged 10 days. Note the marked differences in axon caliber and myelin thickness between normal and trembler mice (indicated by arrows in B) in microscopic sections at equivalent magnifications. Also note the severity of dysmyelination. A single amino acid mutation from leucine to proline produces trembler neuropathy in mice and in humans. (After Notterpek, Shooter, and Snipes, 1997.)

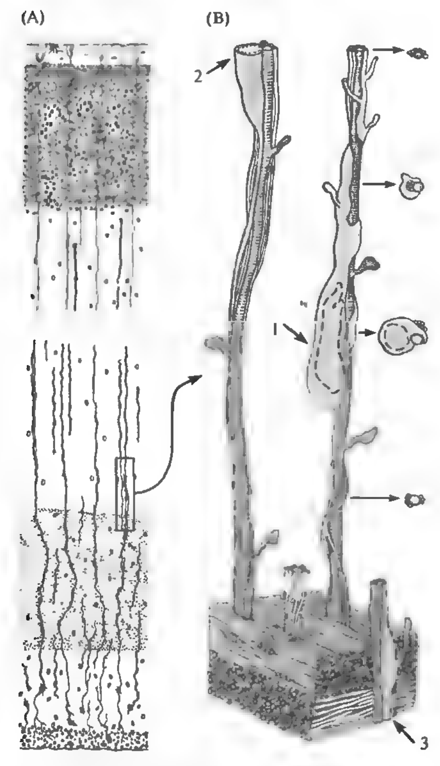
налов в перехватах, участках возле и между перехватами[34, 35]. Эти процессы напоминают кластеризацию рецепторов нейромедиаторов в постсинаптической мембране при формировании синапса. Отростки астроцитов в области перехвата также интенсивно связываются с сакситоксином (токсин, который связывается с натриевыми каналами) (глава 6), что предполагает высокую плотность натриевых каналов на глиальной мембране[36]. Было предположено, что натриевые каналы переносятся от астроцитов к перехватам Ранвье[37], однако это интересное предположение не получило пока прямого доказательства.

Глиальные клетки, развитие ЦНС и секреция факторов роста

Основные аспекты развития, в которые вовлечены глиальные клетки, рассматриваются в главе 23. В этой главе мы рассмотрим несколько ключевых ролей, за которые ответственна глия, шванновские клетки и микроглия. Например, глиальные и шванновские клетки секретируют такие молекулы, как фактор роста нервов и ламинин; эти молекулы способствуют росту нейритов, как в культуре, так и в целом организме[38, 39]. Был также выделен глиальный белок, стимулирующий рост нейритов, GDN (glial-derived nexin). Monard с коллегами предположили, что GDN, который является сильным ингибитором протеаз, препятствует разрушению молекул экстраклеточного матрикса, которые важны для роста[40]. Глиальные клетки могут также быть репеллентами, ингибирующими рост нейритов[41]. Например, белок, известный как NI-25/250, содержится в миелине и олигодендроцитах. Эта молекула останавливает продвижение вперед конусов роста нейронов и вызывает их коллапс. Белки, ингибирующие рост, могут также участвовать в формировании проводящих трактов в спинном мозге, ограничивая рост нервных волокон в неправильном направлении. Возможные эффекты этих белков на процесс регенерации после повреждения рассматриваются в главе 24.

Во время развития нервной системы глиальные клетки играют роль в агрегации нейронов в ядрах. Ядра и структуры, развивающиеся in situ и в культуральных условиях, в самом начале формируются глиальными клетками[42, 43]. Так, например, четко ограниченные группы клеток очерчены глиальными клетками еще до появления нейронов в сомато-сенсорной коре развивающейся мыши (глава 18).

Механизмы, посредством которых радиальные глиальные клетки направляют нейрональную миграцию по время развития, были вскрыты в экспериментах Ракича[44], Хаттена[45, 46] и их коллег (см. также главу 23). В процессе развития коры, гиппокампа и мозжечка человека и обезьяны, нервные клетки мигрируют к местам назначения вдоль отростков глиальных клеток. Движение нервной клетки гиппокампа вдоль радиальной глиальной клетки продемонстрировано



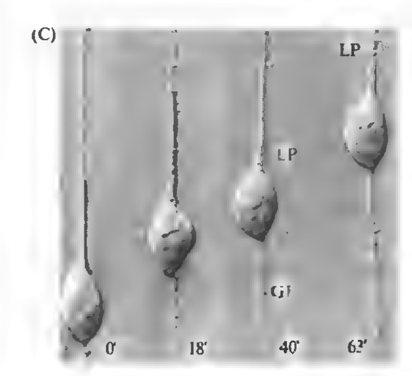


Рис. 8.10. Нейроны мигрируют вдоль радиальной глии в процессе развития. (А) Срез затылочной доли развивающейся коры плода обезьяны в середине беременности. Радиальные глиальные волокна идут от вентрикулярной зоны (внизу) к поверхности развивающейся коры (вверху). (В) Мигрирующая клетка (1) имеет ведущий отросток, располагающийся на радиальной глиальной клетке и использующей его в качестве проводника. Клетка 2, которая продвинулась дальше, оставляет за собой отросток, также прикрепленный к глиальной клетке. Клетка 3 только начинает образовывать отросток, прежде чем начать свою миграцию вдоль глиальной клетки. (С) Миграция гиппокампального нейрона вдоль радиального глиального волокна (GF) *in vitro*. С течением времени лидирующий отросток (LP) продвигается все выше и выше, а за ним следует тело нейрона. Время в минутах указано внизу.

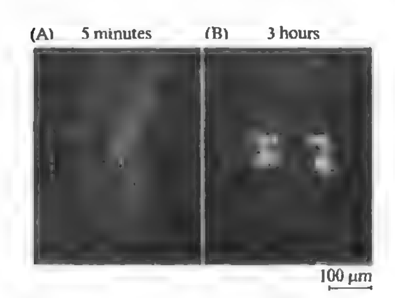
Fig. 8.10. Neurons Migrating along Radial Glia during development. (A) Camera lucida drawing of the occipital lobe of developing cortex of a monkey fetus at mid-gestation. Radial glial fibers run from the ventricular zone below to the surface of the developing cortex above. (B) Three-dimensional reconstruction of migrating neurons. The migrating cell (1) has a voluminous leading process that follows the radial glia, using it as guideline. Cell 2, which has migrated farther, retains a process still connected to the radial glia. Cell 3 is beginning to send a process along the radial glia before migrating. (C) Migration of a hippocampal neuron along a radial glial fiber (GF) in vitro. As time progresses, the leading process (LP) moves farther up, with the neuronal cell body following. Times indicated at the bottom represent real time, in minutes, taken from video photography. (A and B after Rakic, 1988; C from Hatten, 1990.)

на рис. 8.10. Мигрирующие нейроны распознают на поверхности глиальных клеток поверхностные молекулы, специфические к их нейрональному типу. Например, радиальные глиальные клетки из гиппокампа могут направлять миграцию нейронов гиппокампа, но не неокортекса.

Роль микроглиальных клеток в репарации и регенерации в ЦНС

Астроциты, микроглия и шванновские клетки реагируют на нейрональное повреждение репликацией[6, 7]. Они участвуют в удалении продуктов распада и в рубцевании. На первом этапе резидентные микроглиальные клетки и макрофаги, которые проникают в поврежденный участок ЦНС из крови, делятся и удаляют продукты распада умирающих клеток[47].

Мюллер и его сотрудники исследовали роль микроглиальных клеток в регенерации ЦНС у пиявки[48]. (Кстати, именно у пиявки микроглиальные клетки были впервые описаны и получили свое название[49]). В нормальных условиях микроглиальные клетки равномерно распределены в ганглиях и пучках аксонов, которые их соединяют (рис. 8.11). Сразу после повреждения ЦНС микроглиальные клетки мигрируют к месту повреждения со скоростью около 300 мкм/час, аккумулируются на этом месте и фагоцитируют поврежденную ткань. Гибридизация *in situ* и иммунохимические реакции показали, что микроглиальные клетки продуцируют в месте повреждения ламинин[50] (глава 24) — молекулу



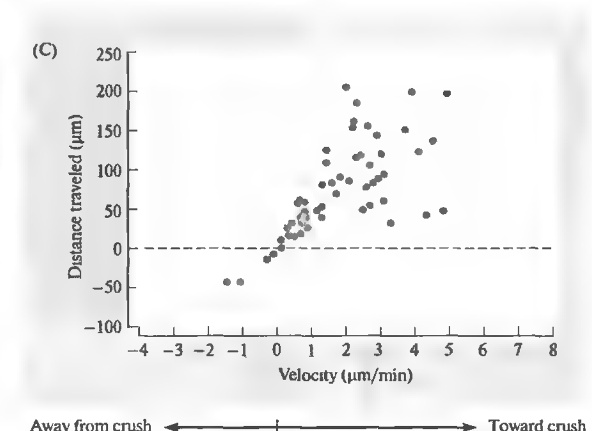


Рис. 8.11. Миграция микроглиальных клеток к участку повреждения в ЦНС. (А) Микроглия в ЦНС пиявки, окрашенная флуоресцентным красителем (Hoechst 33342). Пучок аксонов, связывающих ганглии, был сдавлен 5 минут назад. Участок сдавления отмечен пунктирной линией. Микроглиальные клетки все еще равномерно распределены. (В) Через три часа после повреждения микроглиальные клетки собираются на месте сдавления и начинают производить ламинин. (С) Скорость и расстояние, пройденное микроглиальными клетками по направлению к месту повреждения.

Fig. 8.11. Migration of Microglial Cells in Injured CNS. (A) Microglia in the leech CNS were stained with a fluorescent nuclear dye (Hoechst 33342). The bundle of axons linking ganglia had been crushed 5 minutes earlier. The extent of the crush is indicated by the dotted line. The nuclei of microglial cells were still evenly distributed at this time. (B) Three hours after the injury, microglial cells had accumulated at the crush site. There they produced the growth-promoting molecule laminin. (C) Velocities and distances traveled by microglial cells as they moved toward a lesion in leech CNS. Microglial cells were tracked by video-microscopy at 10-min intervals in injured leech preparations. In uninjured preparations, microglial cells make only short random movements. (A and B after Chen et al., 2000, micrographs kindly provided by K. J. Muller; C after McGlade-McCulloh et al., 1989.)

экстраклеточного матрикса, которая способствует росту нейритов в культуре и *in vivo*, как у пиявки, так и у позвоночных.

Шванновские клетки как пути роста в периферических нервах

Управление ростом аксонов нейронов шванновскими клетками было исследовано в экспериментах Thompson с коллегами на модели концевой пластинки — синапса между двигательным нервным окончанием и скелетной мышцей[51)–53)] (глава 24; рис. 8.12А). Икроножная мышца у взрослых крыс была частично денервирована. Было обнаружено, что неповрежденные аксоны разветвляются и устанавливают контакты с денервированными волокнами. В подобных условиях один аксон в состоянии установить контакты с количеством волокон, в 5 раз превышающим таковое в нормальных условиях. Рост аксонов был визуализирован с помощью антител к нейрофиламентам (рис. 8.12В). Шванновские клетки были окрашены другим специфическим антителом (рис. 8.12В). Прямое наблюдение выявило, что первыми начинают расти шванновские клетки денервированных волокон, направляя отростки к интактным аксонам (рис. 8.12А, с). Только после этого аксоны дают отросток, который следует по пути, сформированному отростком шванновской клетки. Интересно, что имплантация шванновской клетки рядом с неповрежденным аксоном также стимулировала спраутинг аксона, даже в отсутствии денервированного волокна.

В серии других экспериментов периферический нерв был полностью перерезан. Как и предполагалось, после короткой задержки аксоны начали расти из проксимального конца нерва. Однако, как и в предыдущем эксперименте, первым этапом был рост шванновских клеток, по отросткам которых аксоны могли расти к своим мишеням.

Замечание

Хотя эксперименты на нервно-мышечном синапсе ясно продемонстрировали роль шванновских клеток в направлении роста нейритов во время регенерации, следует быть осторожным при обобщении этого правила. Например, в ЦНС пиявки поврежденные аксоны могут расти и восстанавливать свои исходные связи даже после уничтожения всех

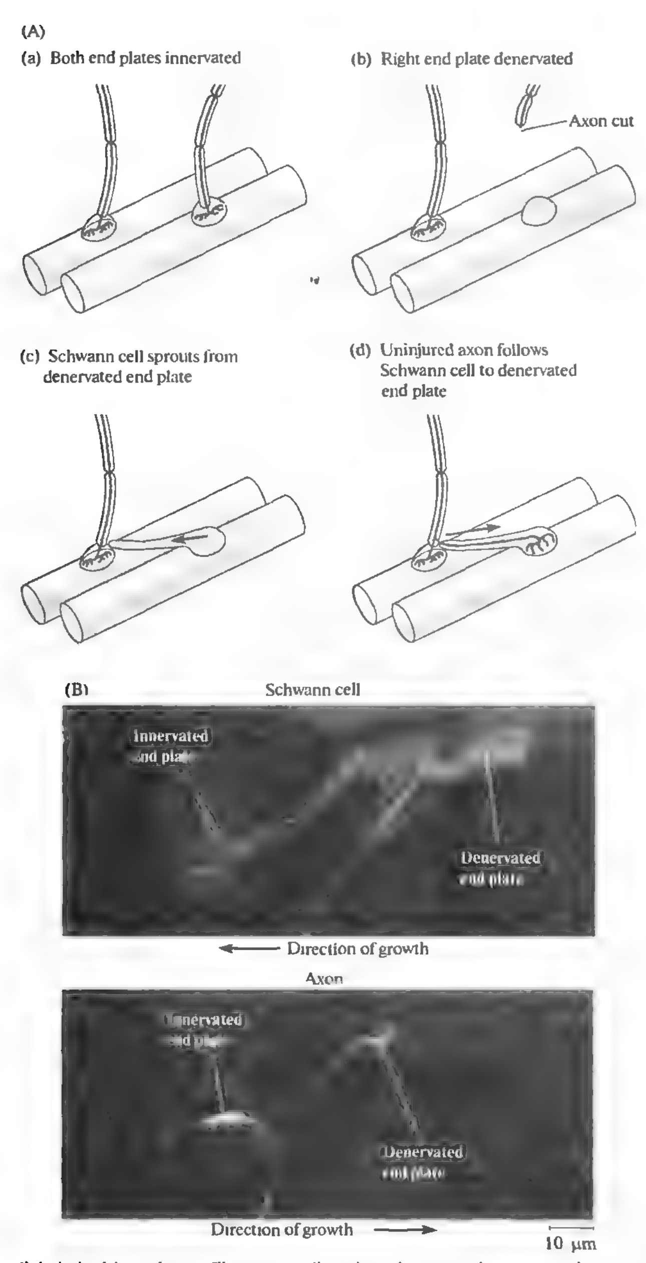


Рис. 8.12. Шванновские клетки — проводники аксонов, растущих к денервированным концевым пластинкам на скелетных мышечных волокнах. (A) Схема событий, происходящих при частичной денервации мышцы крысы: (a) контроль; (b) аксон, иннервирующий волокно справа, был перерезан, что привело к дегенерации нервного окончания; (c) шванновская клетка, остающаяся на денервированном мышечном волокне, прорастает, и один из отростков достигает нервного окончания на близлежащем мышечном волокне; (d) от аксона отрастает новая ветка, которая растет вдоль отростка шванновской клетки к денервированной концевой пластинке и устанавливает с ней синаптический контакт. (B) Рост вновь образованной ветки аксона (окрашенной антителами к нейрофиламентам) к денервированному синапсу вдоль отростка шванновской клетки (окрашенной специфическими к шванновским клеткам антителами 4E2). Спустя три дня после частичной денервации нервная ветка проросла от неповрежденного аксона к денервированной мышце, следуя вдоль отростка шванновской клетки, который образовался ранее.

Fig. 8.12. Role of Schwann Cells in Guiding Axons to denervated motor end plates of skeletal muscle fibers. (A) Schematic representation of the effects of partial denervation of a rat muscle. (a) At normal nerve-muscle synapses, an axon and its Schwann cell are closely apposed. (b) The axon innervating the right-hand muscle fiber is cut, leading to degeneration of the nerve terminal. (c) In response to this denervation, the terminal Schwann cells on the denervated muscle fiber grow processes, one of which reaches the nerve terminal at the adjoining muscle fiber. (d) An axonal sprout is induced from the uninjured nerve terminal. It grows along the Schwann cell process to the denervated end plate, which it reinnervates. (B) Growth of axonal sprouts (labeled with antineurofilament antibody) to denervated synapses along processes extended by Schwann cells (labeled with a monoclonal antibody, 4E2, which is specific for Schwann cell bodies and processes). Three days after partial denervation, a neurofilament-labeled nerve sprout has grown from the innervated junction to a denervated junction by following the Schwann cell process that had grown earlier. The innervated and denervated motor end plates were identified by the patterns of staining of axons and Schwann cells. (After Son and Thompson, 1995; micrographs kindly provided by W. Thompson.)

окружающих их глиальных клеток. Большое количество синапсов устанавливается в ЦНС на эмбриональном этапе развития, когда количество глиальных клеток очень мало. Более того, даже при полном отсутствии глиальных клеток вполне нормальные синапсы формируются в культуральных условиях. Таким образом, маловероятно, что «синапсы не могут ни формироваться, ни функционировать в отсутствии глиальных клеток»[54].

§ 3. Эффекты нейрональной активности на глиальные клетки

Накопление калия во внеклеточном пространстве

Деполяризация глиальной клетки во время активности нейрона проиллюстрирована на рис. 8.13. Регистрация производилась от глиальной клетки в зрительном нерве молодого тритона (*Necturus*). Потенциалы действия, запускаемые в нервных волокнах электрической стимуляцией или вспышками света, проходят мимо глиальной клетки и приводят к ее деполяризации, которая суммируется при прохождении нескольких импульсов[55]. В коре млекопитающих глиальные клетки также деполяризуются, причем деполяризация тем больше, чем больше и чаще активировано рядом расположенных нейронов при стимуляции нервных трактов, периферических нервов, поверхности коры и чувствительных входов[56].

Причиной деполяризации глии является выход калия из аксонов. При накоплении калия во внеклеточном пространстве соотношение $[K]_o/[K]_i$ меняется, что и приводит к изменению мембранного потенциала глиальных клеток. Калий-чувствительные электроды были использованы для измерения накопления калия во внеклеточном пространстве во время нейрональной активности[57].

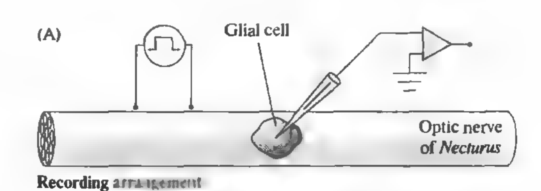
Изменение мембранного потенциала глиальных клеток косвенно отражает уровень проходящих около них нервных импульсов. Калиевая сигнализация между нейронами и глиальными клетками отличается от специфической синаптической активности. Синаптическое взаимодействие ограничивается специализированными участками на телах и дендритах нервных клеток, и может быть как возбуждающим, так и тормозящим. В противоположность этому, сигнализация калием не ограничивается структурами, содержащими рецепторы, и срабатывает независимо от того, что послужило причиной увеличения внеклеточной концентрации калия. В отличие от глиальных клеток, нейроны деполяризуются при повышении внеклеточного K в меньшей степени, поскольку зависимость их мембранного потенциала от наружного K отклоняется от уравнения Нернста в физиологическом диапазоне концентраций (глава 5)

Прохождение токов и движение калия через глиальные клетки

Между участками клетки, имеющими разные потенциалы, протекают токи. Нервные клетки используют этот закон для проведения импульса: токи проходят между невозбужденным участком аксона и той частью, по которой в данный момент проводится потенциал действия. Поскольку глиальные клетки связаны друг с другом контактами с низким сопротивлением, по проводящим свойствам они схожи с одной удлиненной клеткой. Поэтому деполяризация нескольких глиальных клеток при повышении концентрации внеклеточного калия в их окружении приводит к переносу зарядов от клеток, которые не подверглись воздействию. По тому же принципу удлиненная мюллеровская клетка, которая проходит через всю толщину сетчатки, генерирует ток при повышении концентрации калия лишь на небольшой части ее поверхности (рис. 8.6 и 8.14). Входящий ток в участке повышения $[K]_o$, переносимый ионами калия, распространяется к другим областям глиальной клетки и через щелевые контакты — к другим глиальным клеткам. Токи, генерируемые глиальными клетками, вносят вклад в сигналы, регистрируемые внеклеточными электродами от сетчатки (электроретинограмма) или с поверхности головы (электроэнцефалограмма). Такого рода исследования дают весьма ценную информацию при клинической диагностике заболеваний.

Глия как буфер экстраклеточной концентрации калия

Одним из очевидных свойств глии является разделение и группировка нейрональных отростков. В результате этого концентрации



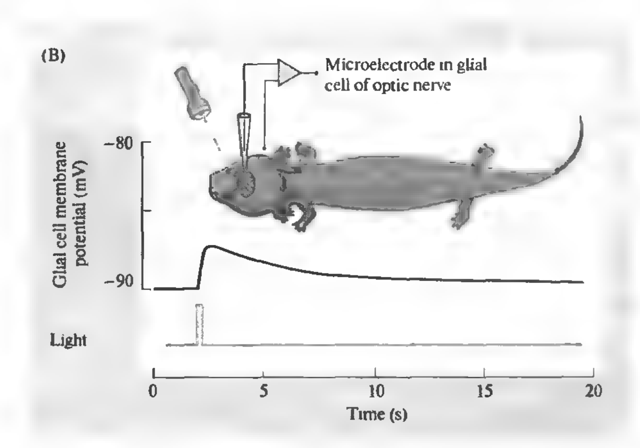


Рис. 8.13. Влияние нейрональной активности на мембранный потенциал глиальных клеток в оптическом нерве тритона. (А) Одновременное возбуждение нервных волокон, вызываемое электрической стимуляцией, приводит к деполяризации глиальной клетки. Амплитуда деполяризации зависит от количества активированных аксонов и частоты стимуляции. (В) Вспышка света длительностью 0,1 с вызывает деполяризацию глиальной клетки в оптическом нерве *in vivo*.

Fig. 8.13. Effect of Action Potentials on Glial Cells in mud puppy optic nerve. (A) Synchronous impulses evoked by electrical stimulation of nerve fibers cause glial cells to become depolarized. The amplitude of the potentials depends on the number of axons activated and on the frequency of stimulation. (B) Illumination of the eye with a 0,1 s flash of light causes depolarization of a glial cell in the optic nerve of an anesthetized mud puppy, with intact circulation. Lower trace monitors light stimulus. (After Orkand, Nicholls, and Kuffler, 1966.)

калия может увеличиваться возле некоторых нейронов, в то время как другие оказываются защищенными глиальными клетками. Это легло в основу привлекательной гипотезы о том, что глиальные клетки регулируют концентрацию калия во внеклеточном пространстве и служат «пространственным буфером»[16, 58]. В соответствии с этой гипотезой глиальные клетки опосредуют захват ионов калия из внеклеточного пространства, поддерживая постоянство окружающей среды. Поскольку глиальные клетки связаны друг с другом, калий может входить в одном участке и выходить в другом, как было описано выше (рис. 8.14). Очевидно, что в результате повышения концентрации калия, он движется через глиальные клетки. Однако, довольно трудно оценить, сколько калия движется по глиальным клеткам и в какой степени это движение важно для уменьшения внеклеточной концентрации калия. Были сделаны попытки оценить роль этого процесса теоретически, на основании предположений о геометрии, проводимости, диффузии и активном транспорте калия в нейронах и глиальных клетках[59].

Эффекты медиаторов на глиальные клетки

Такие медиаторы как ГАМК, глутамат, глицин и ацетилхолин, действуют на мембраны глиальных клеток, вызывая деполяризую-

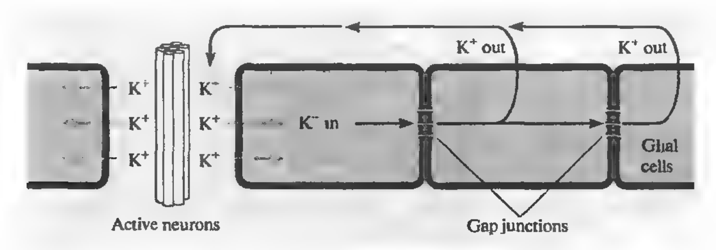


Рис. 8.14. Калиевые каналы в глиальных клетках. Глиальные клетки соединены друг с другом щелевыми контактами. Выделенный активными аксонами калий деполяризует близлежащие глиальные клетки и входит в них, вызывая ток и выходящее движение ионов калия по всей глиальной сети. Таким образом, глиальные клетки могут выполнять роль пространственного буфера внеклеточного калия.

Fig. 8.14. Potassium Currents in Glial Cells. The glial cells in the diagram are linked by gap junctions. Potassium released by active axons in one region depolarizes the glial cell and enters, causing current flow and outward movement of potassium elsewhere in the glial tissue. The concept of spatial buffering of potassium has been postulated as a mechanism for influencing neuronal function by glial cells.

щие или гиперполяризующие ответы[25, 60)–62)]. Активация $ГАМК_А$ рецепторов при воздействии ГАМК на мюллеровские клетки показана на рис. 8.15[63)]. Эти рецепторы во многом, хотя и не во всем, схожи с нейрональными $ГАМК_А$ рецепторами. Физиологическая роль рецепторов к нейромедиаторам на глиальных клетках пока еще не определена.

Вместе с тем, глиальные клетки играют важную роль в захвате медиаторов в ЦНС, как при физиологических, так и при патологических условиях. Уменьшение внеклеточной концентрации выделяемых в синапсах медиаторов (глутамата, норадреналина, глицина) происходит отчасти в результате простой диффузии, однако, основную роль в этом процессе играет захват медиаторов нейронами и глиальными клетками[64)–66)]. Как и в нейронах, транспорт глутамата в глиальные клетки сочетается со входом натрия по его электрохимическому градиенту (глава 4). Если механизм удаления не работает, внеклеточная концентрация глутамата достигает очень высокого уровня, приводя к избыточной активации NMDA рецепторов, массивному входу кальция и клеточной смерти. Количественные расчеты показывают, что система транспорта, сосредоточенная в глиальных клетках, играет ключевую роль в предотвращении избыточного накопления глутамата во внеклеточном пространстве. Было также показано, что у трансгенной мыши, у которой в астроцитах отсутствует глутаматный транспортер GLT-1, развивается эпилепсия и повышенная чувствительность к конвульсантам[25)].

Освобождение медиаторов глиальными клетками

При значительной деполяризации глиальных клеток под воздействием повышенного внеклеточного калия или глутамата, а также при повышении внутриклеточной концентрации ионов натрия, глиальные клетки начинают выделять глутамат во внеклеточное пространство[67)]. В основе этого процесса лежит механизм обратного транспорта, описанный в главе 4. На рис. 8.16 изображен эксперимент, показывающий электрический ток, который возникает при освобождении глутамата глиальными клетками. Процесс обратного транспорта может в значительной степени усугубить последствия повреждения мозга. Поврежденные и погибающие нервные клетки освобождают глутамат и K^+ и таким образом деполяризуют глиальные клетки (и другие нейроны), которые в свою очередь освобождают еще больше глутамата.

Одним из лучших примеров освобождению медиатора глиальными клетками является регенерация в периферической нервной системе. В денервированных двигательных концевых пластинках шванновские клетки занимают места, освобождаемые двигательными нервными окончаниями, и выделяют ацетилхолин, приводя к генерации миниатюрных потенциалов в мышце[68)].

Кальциевые волны в глиальных клетках

У глиальных клеток, растущих в культуре, а также и *in situ*, можно наблюдать фено-

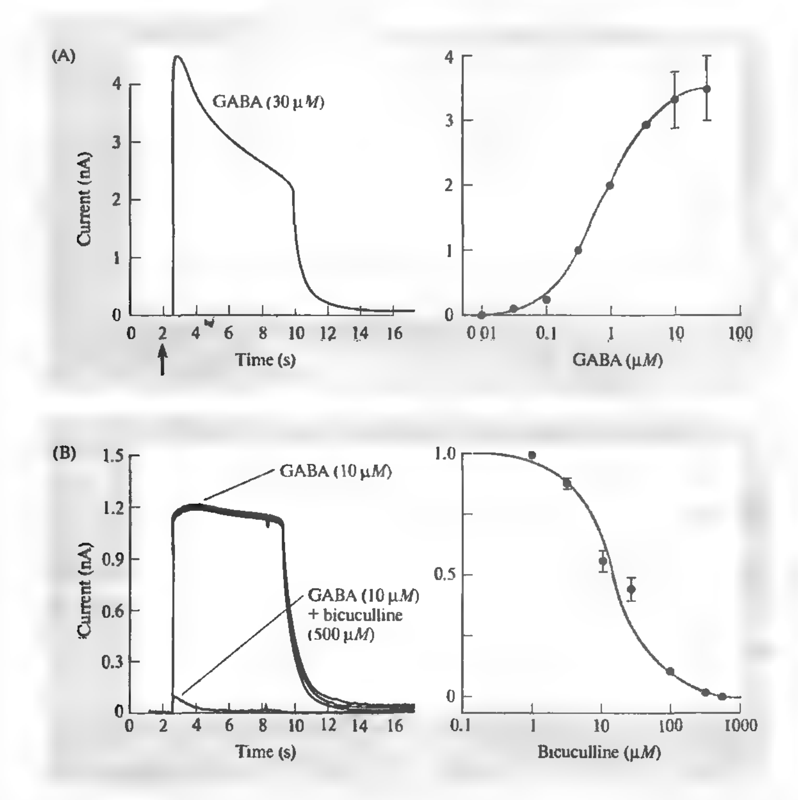


Рис. 8.15. Ответы глиальных клеток на ГАМК. (А) Ток, вызываемый ГАМК (GABA) в мюллеровской глиальной клетке сетчатки. Концентрационная зависимость ответов, вызываемых ГАМК (справа). (В) Ответы, вызываемые ГАМК, блокируются бикукуллином — антагонистом ГАМК$_A$ рецепторов.

Fig. 8.15. Responses of Glial Cells to GABA. Responses of Muller glial cells in skate retina to GABA. (A) Current induced by GABA (30 μM) in a glial cell voltage-clamped at 0 mV. The dose–response relation for the peak of the GABA current is shown on the right (error bars indicate standard error of the mean). (B) The effect of GABA was blocked by bicuculline, a GABA$_A$ antagonist. (After Qian et al., 1996.)

мен сетевого увеличения внутриклеточного кальция, выделяемого из внутриклеточных депо (рис. 8.17). Используя флуоресцентные зонды, можно наблюдать эти осцилляторные волны (или «кальциевые спайки»), проходящие через щелевые контакты между глиальными клетками[69, 70]. Кальциевые волны могут запускаться деполяризацией, медиаторами, механической стимуляцией. Они напоминают кальциевые волны в нейрональных сетях[71] (глава 23). Newman с коллегами показали, что распространяющиеся кальциевые волны могут запускать освобождение глутамата глиальными клетками в сетчатке, что, в свою очередь, может влиять на паттерны нейрональной активности[70]. Физиологическая роль этих волн пока неизвестна.

Перенос метаболитов от глиальных клеток к нейронам

Исследования на пчелах и позвоночных показали, что глиальные клетки могут участвовать в доставке к нейронам питательных веществ[72)—75]. В агрегатах фоторецепторов и мюллеровских клеток, изолированных из сетчатки морской свинки, было показано, что молочная кислота (лактат), выработанная глиальными клетками из гликогена, накапливается во внеклеточной жидкости. В условиях повышенной нейрональной активности лактат переносится от глиальных клеток к фоторецептивным нейронам. Наличие такого механизма в культуральных условиях предполагает, что и в интактной ЦНС глиальные клетки могут участвовать в снабжении ней-

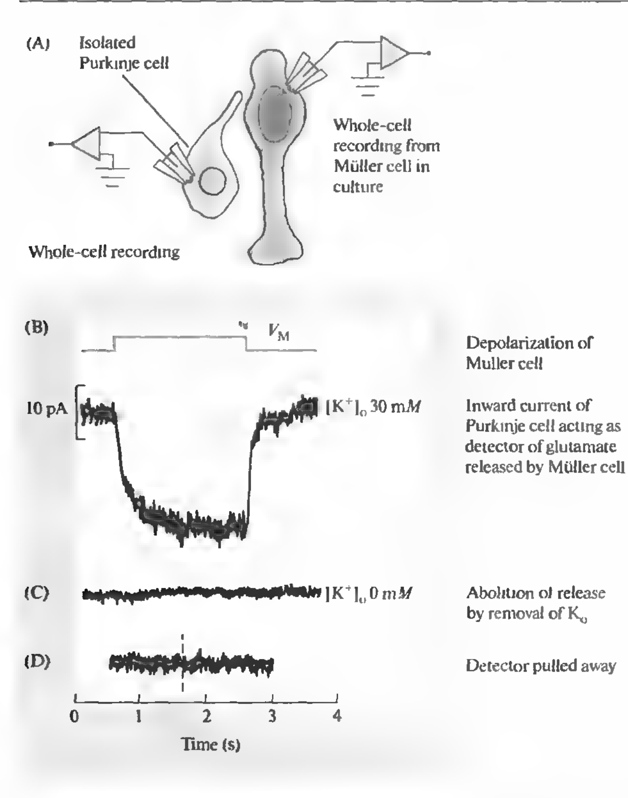


Рис. 8.16. Освобождение глутамата глиальными клетками. Освобождение глутамата в результате реверсии транспортера глутамата в мюллеровских клетках. (A) Вызываемое деполяризацией освобождение глутамата из мюллеровской клетки (справа) определяется по вызываемому освобождающимся глутаматом току в расположенной рядом клетке Пуркинье (слева). Клетка Пуркинье используется в качестве высокочувствительного детектора глутамата. (B) Деполяризация мюллеровской клетки от −60 до +20 мВ вызывает в близлежащей клетке Пуркинье входящий ток, опосредованный глутаматными рецепторами. Ответ в клетке Пуркинье исчезает, если клетка Пуркинье удаляется от мюллеровской клетки (C), а также при удалении калия из внеклеточного раствора (D). В растворе, содержащем 0 ммоль K^-, обратный транспорт глутамата из мюллеровской клетки блокируется.

Fig. 8.16. Release of Glutamate by Glial Cells. Release of glutamate generated by reversal of the glutamate uptake carrier in a Müller cell. (A) Depolarization-induced release of glutamate from a Müller cell (right) is monitored by recording glutamate-elicited currents from an adjacent Purkinje cell (left). The Purkinje cell acts as a detector with high sensitivity and time resolution. (B) Depolarization of the Müller cell from −60 to +20 mV (top trace) elicits an inward current in the nearby Purkinje cell. The Purkinje cell current is generated by activation of its glutamate receptors. The response to glutamate disappears when the Purkinje cell is moved away from the Müller cell (C) or when extracellular K^+ is omitted (D). In fluid containing 0 m*M* K^+, reverse glutamate transport by the Müller cell is blocked. (After Billups and Attwell, 1996.)

ронов питательными веществами при повышенной активности или же при недостатке кислорода.

Эффекты глиальных клеток на нейрональную сигнализацию

Описанные в предыдущих разделах эксперименты показывают важную роль глиальных клеток в развитии, регенерации и формировании миелина. На сегодняшний день довольно хорошо изучены также ионные каналы в мембранах глиальных клеток и роль глии в регуляции внеклеточной среды. Многие предположения о роли глиальных клеток были сделаны на основании экспериментов, проведенных в культуральных условиях, что не означает, что они верны *in vivo*. Вдобавок свойства глиальных клеток сильно варьируют в различных областях ЦНС. Например, оптический нерв, хотя и является распространенным препаратом для исследования глии[76)], в то же время не является наиболее репрезентативным препаратом для исследования глии в целом, поскольку в нем нет синапсов. До сих пор нет достаточных доказательств тому, что глиальные клетки играют важную роль в динамических процессах, таких, например, как рефлекс на растяжение, или в ответах комплексных клеток зрительной коры в нормальных физиологических условиях (глава 20).

§ 4. Глиальные клетки и гематоэнцефалический барьер

Близкое расположение глиальных клеток, капилляров и нейронов в мозге предполагает,

Рис. 8.17. Кальциевые волны в мюллеровских клетках саламандры. Кальциевые волны, вызванные добавлением рианодина в отсутствие внеклеточного кальция, начинаются с апикального конца клетки и распространяются по направлению к концевой ножке. Внутриклеточная концентрация кальция определялась с помощью кальций-чувствительной метки fura-2 с интервалом 7 секунд. Кальциевые волны могут также распространяться между глиальными клетками через щелевые контакты. Схожие волны могут запускаться физиологическими стимулами. Эти волны также напоминают волны в нейрональных клетках на ранних этапах развития.

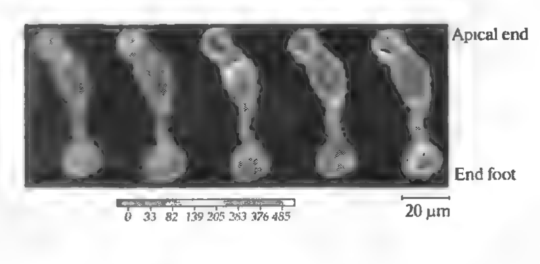


Fig. 8.17. Calcium Wave in a Dissociated Salamander Müller Cell. The Ca^{2+} wave, elicited by addition of 100 n*M* ryanodine in the absence of extracellular Ca^{2+}, begins at the apical end of the cell and travels toward the cell end foot. The intracellular Ca^{2+} concentration was imaged using the Ca^{2+}-indicator dye fura-2. Images were obtained at 7 s intervals. With glial cells that are coupled by gap junctions, the calcium waves can spread from cell to cell in a continuous progression. Similar waves are initiated by physiological stimuli. They resemble those seen in neurons during development. (After Keirstead and Miller, 1997; image kindly provided by S. Keirstead.)

что глиальные клетки могут быть частью гематоэнцефалического барьера. Гематоэнцефалический барьер располагается в местах соединения между специализированными эндотелиальными клетками, выстилающими кровеносные капилляры в мозге[77]. Роль глиальных клеток была показана при выращивании эндотелиальных клеток и астроцитов в культуральных условиях[78, 79]. При выращивании без астроцитов эндотелиальные клетки редко соединяются друг с другом. Однако, в присутствии астроцитов происходит формирование полноценных плотных контактов, таких как *in vivo*. Эти контакты, которые полностью перекрывают межклеточное пространство между эндотелиальными клетками, составляют основу для непроницаемости мозговых капилляров. Для того, чтобы проникнуть из крови в мозг, молекулы должны пройти через эндотелиальные клетки, а не между ними. В свою очередь, наличие в культуре эндотелиальных клеток из капилляров мозга вызывает появление в астроцитах скоплений мембранных частиц. Взаимодействия между астроцитами и эндотелиальными клетками мозговых капилляров носят специфический характер. Фибробласты или эндотелиальные клетки из периферических сосудов не дают схожего результата. В настоящее время исследуются способы, дающие возможность вызвать разобщение эндотелиальных клеток, с тем чтобы увеличить проницаемость капилляров. Это позволило бы обойти гематоэнцефалический барьер (см. также следующий раздел) и обеспечить доставку в мозг тех фармакологических препаратов, которые в нормальных условиях через него не проходят[80].

Предположение о роли астроцитов в кровоснабжении мозга

Три факта свидетельствуют о возможной роли астроцитов в мозге млекопитающих. Во-первых, они окружают капилляры мозга своими концевыми отростками (именно это свойство привело Гольджи и многих других к предположению о том, что они занимаются доставкой веществ к нейронам). Во-вторых, активность в определенном участке мозга вызывает значительное увеличение кровоснабжения через этот участок, что отчетливо видно при использовании позитронной томографии (positron emission tomography, PET), магнитного резонанса (magnetic resonance imaging, MRI) и оптической регистрации. В-третьих, глиальные клетки отслеживают общий уровень активности в своем окружении. Паульсон и Ньюман[86] предложили интересную гипотезу о том, что концевые отростки деполяризованных астроцитов могут влиять на капилляры и вызывать местное расщирение кровеносных сосудов. Посредством глиальной сигнализации активные нейроны могли бы получать таким образом дополнительное количество кислорода и глюкозы. Относительно механизмов можно предполагать, что освобождение калия, протонов или закиси азота (NO), освобождаемых из концевых отростков астроцитов, может влиять на эндотелиальные клетки капилляров. Предположение Paulson и Newman сродни исходному предположению Гольджи, однако в их гипотезе сигналы имеют обратное направление: не глиальные клетки переносят питательные вещества через свою цитоплазму из крови к нейронам,

а нейрональная активность вызывает локальное расширение кровеносных сосудов и увеличение кровоснабжения именно там, где это необходимо.

§ 5. Глиальные клетки и иммунные ответы в ЦНС

До совсем недавних пор считалось, что ткань центральной нервной системы находится вне контроля иммунной системы. Наличие гематоэнцефалического барьера, отсутствие лимфатической системы и сравнительная легкость, с которой приживаются участки мозга при пересадке, — все это предполагает отсутствие иммунного ответа на чужеродные антигены. В результате функции ЦНС не нарушаются при массивных аллергических реакциях, вызываемых, например, укусом пчелы. Однако, астроциты в культуре и *in situ* взаимодействуют с Т-лимфоцитами, чья активность или стимулирует, или подавляет. Получены доказательства в пользу того, что микроглия и активированные Т-лимфоциты могут входить в мозг и вызывать острое воспаление в мозговой ткани[87, 88]. Роль глии во взаимодействии между нервной и иммунной системами остается актуальной и еще далекой от решения проблемой.

Выводы

- Глиальные клетки в мозге и шванновские клетки на периферии создают окружение нейронов.
- Олигодендроциты имеют короткие отростки и миелинизируют крупные аксоны.
- Астроциты окружают мозговые капилляры.
- шванновские клетки миелинизируют периферические аксоны и продуцируют трофические молекулы.
- Микроглиальные клетки удаляют продукты распада после повреждения нервной системы и вовлечены в воспалительные ответы в нервной системе.
- Глиальные клетки имеют более отрицательный потенциал, чем нейроны, и не генерируют потенциалы действия.
- Глиальные клетки электрически связаны друг с другом, но не с нейронами.
- Мембраны глиальных клеток содержат натриевые, калиевые, кальциевые ионные каналы, а также рецепторы, насосы и транспортеры.
- Глиальные клетки играют роль в развитии нервной системы и в поддержании гомеостаза среды, окружающей нейроны.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Kettenmann, H., and Ransom, B. R. (eds.). 1995. *Neuroglia*. Oxford University Press, New York.
- Kuffler, S. W., and Nicholls, J. G. 1966. The physiology of neuroglial cells. *Ergeb. Physiol.* 57: 1–90.
- Newman, E., and Reichenbach, A. 1996. The Müller cell: A functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 19: 307–312.
- Paulson, O. B., and Newman, E. A. 1987. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237: 896–898.
- Porter, J. T., and Mccarthy, K. D. 1998. Astrocytic neurotransmitter receptors in-situ and in-vivo. *Prog. Neurobiol.* 51: 439–455.
- Ransom, B. R., and Orkand, R. K. 1996. Glial-neuronal interaction in non-synaptic areas of the brain: Studies in the optic nerve. *Trends Neurosci.* 19: 352–358.
- Ransom, B. R., and Sontheimer, H. 1992. The neurophysiology of glial cells. *J. Clin. Neurophysiol.* 9: 224–251.
- Saunders, N. R., Habgood, M. D., and Dziegielewska, K. M. 1999. Barrier mechanisms in the brain. I. Adult brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 11–19.

Статьи

- Araque, A., Li, N., Doyle, R. T., and Haydon, P. G. 2000. SNARE protein-dependent glutmate release from astrocytes. *J. Neurosci.* 20: 666–673.
- Kuffler, S. W., and Potter, D. D. 1964. Glia in the leech central nervous system: Physiological properties and neuron-glia relationship. *J. Neurophysiol.* 27: 290–320.
- Newman, E. A., and Zahs, K. R. 1998. Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J. Neurosci.* 18: 4022–4028.
- Pareek, S., Notterpek, L., Snipes, G. J., Naef, R., Sossin, W., Laliberte, J., Iacampo, S., Suter, U., Shooter, E. M., and Murphy, R. A. 1997. Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin. *J. Neurosci.* 17: 7754–7762.

◇ Paulson, O. B., and Newman, E. A. 1987. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237: 896–898.

◇ Rasband, M. N., Peles, E., Trimmer, J. S., Levinson, S. R., Lux, S. E., and Shrager, P. 1999. Dependence of nodal sodium channel clustering on paranodal axoglial contact in the developing CNS. *J. Neurosci.* 19: 7516–7528.

◇ Son, Y. J., and Thompson, W. J. 1995. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14: 133–141.

Цитированная литература

1. Virchow, R. 1959. *Cellularpathologie*. Hirschwald, Berlin. (Excerpts are from pp. 310, 315, and 317.)
2. Ramón y Cajal, S. [1909–1911] 1995. *Histology of the Nervous System*, Vol. 1. Oxford University Press, New York.
3. Golgi, C. 1903. *Opero Omnia*, Vols. 1 and 2. U. Hoepli, Milan, Italy.
4. Kettenmann, H., and Ransom, B. R. (eds.). 1995. *Neuroglia*. Oxford University Press, New York.
5. Ransom, B. R. 1991. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633: 19–26.
6. Kreutzberg, G. W. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 312–318.
7. Brown, H. C., and Perry, V. H. 1998. *Glia* 23: 361–373.
8. Martini, R., and Schachner, M. 1997. *Glia* 19: 298–310.
9. Bignami, A., and Dahl, D. 1974. J. Comp. Neurol. 153: 27–38.10Stent, G. S., et al. 1992. *Int. Rev. Neurobiol.* 33: 109–193.
10. Stent, G. S., et al. 1992. *Int. Rev. Neurobiol.* 33: 109–193, et al., 1992.
11. Luskin, M. B. 1998. *J. Neurobiol.* 36: 221–233.
12. Kuffler, S. W., and Potter, D. D. 1964. *J. Neurophysiol.* 27: 290–320.
13. Kuffler, S. W. 1967. *Proc. R. Soc. Lond. B* 168: 1–21.
14. Butt, A. M., and Ransom, B. R. 1993. *J. Comp. Neurol.* 338: 141–158.
15. Ransom, B. R., and Sontheimer, H. 1992. *J. Clin. Neurophysiol.* 9: 224–251.
16. Kuffler, S. W., and Nicholls, J. G. 1966. *Ergeb. Physiol.* 57: 1–90.
17. Kuffler, S. W., Nicholls, J. G., and Orkand, R. K. 1966. *J. Neurophysiol.* 29: 768–787.
18. Rojas, L., and Orkand, R. K. 1999. *Glia* 25: 199–203.
19. Newman, E., and Reichenbach, A. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 307–312.
20. Brew, H., et al. 1986. *Nature* 324: 466–468.
21. Rose, C. R., Ransom, B. R., and Waxman, S. G. 1997. *J. Neurophysiol.* 78: 3249–3258.
22. Ritchie, J. M. 1987. *J. Physiol.* (Paris) 82: 248–257.
23. Astion, M. L., Chavatal, A., and Orkand, R. K. 1991. *Glia* 4: 461–468.
24. Szatkowski, M., Barbour, B., and Attwell, D. 1990. *Nature* 348: 443–446.
25. Porter, J. T., and Mccarthy, K. D. 1998. *Prog. Neurobiol.* 51: 439–455.
26. Loewenstein, W. R. 1999. The Touchstone of Life. Oxford University Press, Oxford, England.
27. Rose, C. R., and Ransom, B. R. 1996. *J. Physiol.* 491: 291–305.
28. Zahs, K. R., and Newman, E. A. 1997. *Glia* 20: 10–22.
29. Bunge, R. P. 1968. *Physiol. Rev.* 48: 197–251.
30. Black, J. A., and Waxman, S. G. 1988. *Glia* 1: 169–183.
31. Waxman, S. G. 1997. *Curr. Biol.* 7: 406–410.
32. Notterpek, L., Shooter, E. M., and Snipes, G. J. 1997. *J. Neurosci.* 17: 4190–4200.
33. Tobler, A. R., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 2027–2036.
34. Kaplan, M. R., et al. 1997. *Nature* 386: 724–728.
35. Rasband, M. N., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 7516–7528.
36. Ritchie, J. M., et al. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8290–9294.
37. Shrager, P., Chiu, S. Y., and Ritchie, J. M. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 948–952.
38. Heuman, R. 1987. *J. Exp. Biol.* 132: 133–150.
39. van der Laan, L. J., et al. 1997. *J. Neurosci. Res.* 50: 539–548.
40. Bleuel, A., et al. 1995. *J. Neurosci.* 15: 759–761.
41. Caroni, P., and Schwab, M. E. 1988. *J. Cell Biol.* 106: 1281–1288.
42. Willbold, E., et al. 1995. *Eur. J. Neurosci.* 7: 2277–2284.
43. Cooper, N. G. F., and Steindler, D. A. 1986. *Brain Res.* 380: 341–348.
44. Rakic, P. 1981. *Trends Neurosci.* 4: 184–187.
45. Hatten, M. E. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 511–539.
46. Zheng, C., Heintz, N., and Hatten, M. E. 1996. *Science* 272: 417–419.
47. Smith, P. J., Howes, E. A., and Treherne, J. E. 1987. *J. Exp. Biol.* 132: 59–78.
48. McGlade-McCulloh, E., et al. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1093–1097.

49. Del Rio-Hortega, P. 1920. *Trob. Lab. Invest. Biol. Madrid* 18: 37–82.
50. Luebke, A. E., Dickerson, E. M., and Muller, K. J. 1993. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 1084.
51. Son, Y. J., and Thompson, W. J. 1995. *Neuron* 14: 125–132.
52. Son, Y. J., and Thompson, W. J. 1995. *Neuron* 14: 133–141.
53. Son, Y. J., Trachtenberg, J. T., and Thompson, W. J. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 280–285.
54. Pfrieger, F. W., and Barres, B. A. 1996. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 615–621, p. 619.
55. Orkand, R. K., Nicholls, J. G., and Kuffler, S. W. 1966. *J. Neurophysiol.* 29: 788–806.
56. Ransom, B. R., and Goldring, S. 1973. *J. Neurophysiol.* 36: 869–878.
57. Dietzel, I., Heinemann, U., and Lux, H. D. 1989. *Glia* 2: 25–44.
58. Karowski, C. J., Lu, H-K., and Newman, E. A. 1989. *Science* 224: 579–580.
59. Odette, L. L., and Newman, E. A. 1988. *Glia* 1: 198–210.
60. Conti, F., et al. 1997. *Mol. Neurobiol.* 14: 1–18.
61. Reichelt, W., et al. 1997. *Neuroreport* 8: 541–544.
62. Lohr, C., and Deitmar, J. W. 1997. *J. Exp. Biol* 200: 2565–2573.
63. Qian, H., et al. 1996. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263: 791–796.
64. Tanaka, K., et al. 1997. *Science* 276: 1699–1702.
65. Takahashi, M., et al. 1997. *J. Exp. Biol.* 200: 401–409.
66. Matsui, K., Hosoi, N., and Tachibana, M. 1999. *J. Neurosci.* 19: 6755–6766.
67. Billups, B., and Attwell, D. 1996. *Nature* 379: 171–174.
68. Dennis, M., and Miledi, R. 1974. *J. Physiol.* 237: 431–452.
69. Newman, E. A., and Zahs, K. R. 1997. *Science* 275: 844–847.
70. Newman, E. A., and Zahs, K. R. 1998. *J. Neurosci.* 18: 4022–4028.
71. Verkhratsky, A., Orkand, R. K., and Kettenmann, H. 1998. *Physiol. Rev.* 78: 99–139.
72. Tsacopoulos, M., and Magistretti, P. J. 1996. *J. Neurosci.* 16: 877–885.
73. Tsacopoulos, M., Poitry-Yamate, C. L., and Poitry, S. 1997. *J. Neurosci.* 17: 2383–2390.
74. Coles, J. A., and Abbott, N. J. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 358–362.
75. Ransom, B. R., and Fern, R. 1997. *Glia* 21: 134–141.
76. Ransom, B. R., and Orkand, R. K. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 352–358.
77. Brightman, M. W., and Reese, T. S. 1969. *J. Cell Biol.* 40: 668–677.
78. Tao-Cheng, J. H., Nagy, Z., and Brightman, M. W. 1987. *J. Neurosci.* 7: 3293–3299.
79. Tao-Cheng, J. H., Nagy, Z., and Brightman, M. W. 1990. *J. Neurocytol.* 19: 143–153.
80. Rubin, L. L., et al. 1992. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633: 420–425.
81. Saunders, N. R., Habgood, M. D., and Dziegielewska, K. M. 1999. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 26: 11–19.
82. Reese, T. S., and Karnovsky, M. J. 1967. *J. Cell Biol.* 34: 207–217.
83. Saunders, N., and Dziegielewska, K. M. 1997. *News Physiol. Sci.* 12: 21–31.
84. Balslev, Y., Saunders, N. R., and Mollgard, K. 1997. *J. Neurocytol.* 26: 133–148.
85. Saunders, N. R., Habgood, M. D., and Dziegielewska, K. M. 1999. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 85–91.
86. Paulson, O. B., and Newman, E. A. 1987. *Science* 237: 896–898.
87. Neumann, H., et al. 1996. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2582–2590.
88. Neumann, H., et al. H. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5779–5784.

Глава 9

Основы прямой синаптической передачи

Синапсы являются местами контакта между нервными клетками и их мишенями, в которых сигналы передаются от одной клетки к другой. В электрических синапсах ток из пресинаптического нервного окончания напрямую проходит в постсинаптическую клетку и меняет ее мембранный потенциал. Электрическая передача преобладает в нервной системе беспозвоночных, но встречаются электрические синапсы и в ЦНС млекопитающих. В химических синапсах потенциал действия, приходящий в нервные окончания, вызывает освобождение молекул нейромедиатора. В прямых химических синапсах медиатор связывается с ионотропными рецепторами на мембране постсинаптической клетки, которые одновременно являются ионными каналами. В результате рецепторы изменяют свою конформацию, каналы открываются, через них проходят ионы, и мембранный потенциал меняется. В непрямых химических синапсах в передачу сигнала вовлечены постсинаптические метаботропные рецепторы и внутриклеточные вторичные посредники (глава 10).

Каналы, которые открываются в возбуждающих синапсах, позволяют катионам входить внутрь клетки, что сдвигает потенциал мембраны в сторону порога потенциала действия. В тормозящих синапсах медиаторы открывают каналы, которые проницаемы для анионов, что удерживает потенциал на более отрицательных значениях. Как в возбуждающих, так и в тормозящих синапсах направление потока ионов определяется равновесием концентрационного и электрического градиентов, действующих на проницаемые ионы.

Синапсы между двигательными нервами и мышечными волокнами были препаратом, на котором были вскрыты основные механизмы прямой химической передачи. В ЦНС млекопитающих прямая возбуждающая и тормозящая химическая передача происходит в синапсах, использующих в качестве нейромедиаторов ацетилхолин, глутамат, ГАМК, серотонин и пурины, которые освобождаются и активируют ионотропные рецепторы.

В одном химическом синапсе может освобождаться более одного типа медиатора, и многие медиаторы могут действовать быстро, связываясь и открывая ионные каналы напрямую, и более медленно, посредством непрямых механизмов.

Передача информации от одного нейрона к другому, а также от нейрона к эффекторной клетке, например, мышечному волокну, происходит в специализированном месте контакта, которое называется **синапсом**. В этой главе будут рассмотрены основные принципы **прямой синаптической передачи**. Прямые, также называемые «быстрыми», синапсы могут быть электрическими, в которых передача основана на прохождении тока от пресинаптической клетки к постсинаптической. Однако, более распространенными являются прямые химические синапсы, в которых окончания аксона освобождают нейромедиатор, который связывается с рецепторами на клетках-мишенях, являющимися одновременно ионными каналами.

В последующих главах будет описано, каким образом химические нейромедиаторы влияют на клетки-мишени непрямым образом, связываясь с рецепторами, которые запускают каскады внутриклеточных реакций (глава 10), каким образом нейромедиаторы освобождаются (глава 11), как нейромедиаторы синтезируются и хранятся внутри нервных окончаний (глава 13), а также как эффективность синаптической передачи может меняться в результате повторной активности (Глава 12). Поскольку синаптические взаимодействия весьма разнообразны и сложны, было бы полезно начать с исторического обзора основных идей.

(A) Electrical synapse

Presynaptic cell

Postsynaptic cell

Connexon

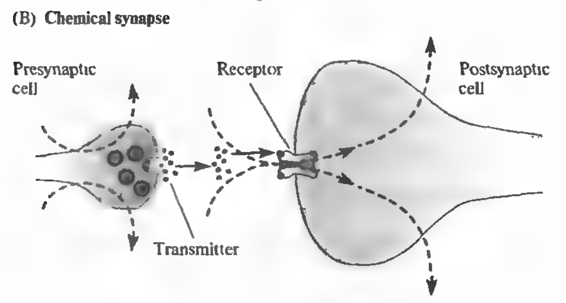


Рис. 9.1. Электрическая и химическая синаптическая передача. (A) В электрических синапсах ток протекает напрямую от одной клетки к другой через коннексоны — межклеточные каналы, которые кластеризуются с образованием щелевых контактов (gap junctions). (B) В химических синапсах деполяризация пресинаптического нервного окончания вызывает освобождение медиатора, который взаимодействует с рецепторами на постсинаптическом нейроне, вызывая возбуждение или торможение.

Fig. 9.1. Electrical and Chemical Synaptic Transmission. (A) At electrical synapses, current flows directly from one cell to another through connexons, intercellular channels that cluster to form gap junctions. (B) At a chemical synapse, depolarization of the presynaptic nerve terminal triggers the release of neurotransmitter molecules, which interact with receptors on the postsynaptic neuron, causing excitation or inhibition.

§ 1. Нервные клетки и синаптические контакты

Тот факт, что основные составляющие компоненты синапса — пресинаптическое окончание и постсинаптическая клетка — морфологически разобщены, стал очевиден не сразу. Во второй половине XIX века часть ученых придерживалась **клеточной теории**, которая считала, что нейроны являются независимыми единицами нервной системы, другие же считали, что нервные клетки представляют собой **синцитиум**, в котором клетки соединены через протоплазматические мостики. Только в конце XIX века клеточная теория стала общепринятой. Оставалось лишь получить с помощью электронной микроскопии окончательное доказательство того, что каждый нейрон полностью окружен своей собственной плазматической мембраной. Но даже электронная микроскопия и другие современные подходы обнаружили, что некоторые нейроны в действительности контактируют посредством каналов, называемых коннексонами, которые проницаемы для ионов и других небольших молекул (глава 7).

Отсутствие согласия по поводу структуры синапсов усугублялось несогласием по поводу их функции. В 1843 году Дюбуа-Реймонд показал, что электрический ток вовлечен как в сокращение мышцы, так и в проведение возбуждения по аксону, и требовалось лишь небольшое развитие этой идеи, чтобы сделать вывод о том, что передача возбуждения с нерва на мышцу также опосредована прохождением электрического тока (рис. 9.1A)[1]. Сам же Дюбуа-Реймонд предпочитал иное объяснение: он считал, что нервное окончание выделяет возбуждающее вещество, которое вызывает сокращение мышцы (рис. 9.1B). Однако, идея живого электричества имела столь сильное влияние, что прошло более 100 лет, прежде чем были получены доказательства, опровергающие предположение об электрической природе передачи возбуждения с нерва на мышцу, а также между нервными клетками.

Химическая передача в вегетативной нервной системе

Одной из причин того, почему идея химической синаптической передачи казалась маловероятной, была скорость передачи сигналов между нервными клетками и между нервом и мышцей. Доли секунды, которые разделяют стимуляцию двигательного нерва и сокращение соответствующей мышцы, казались недостаточными для того, чтобы обеспечить достаточное время для освобождения химического передатчика (посредника, трансмиттера,

медиатора) из нервного окончания и взаимодействия с рецепторами на постсинаптической мембране. Однако в вегетативной нервной системе, которая контролирует железы и кровеносные сосуды, такого рода проблемы не существует: эффект нервной стимуляции здесь развивается медленно и довольно продолжителен, около нескольких секунд (глава 16).

В 1892 годы Лэнгли предположил, что синаптическая передача в вегетативных ганглиях млекопитающих имеет химическую природу, а не электрическую. Он основывался на наблюдении о том, что передача через цилиарный ганглий избирательно блокируется никотином[2]. Примерно через 10 лет Эллиот обнаружил, что экстракт, полученный из надпочечников, — адреналин (эпинефрин) — производит на мишени такое же воздействие, как и стимуляция симпатических нервов. Это позволило предположить, что адреналин может секретироваться нервными окончаниями в качестве медиатора[3]. Однако лишь в 1921 году Леви поставил прямой и простой опыт, в котором была установлена химическая природа передачи в вегетативных синапсах между блуждающим нервом и сердцем[4]. Он перфузировал сердце лягушки и стимулировал блуждающий нерв, вызывая замедление сердцебиений. Когда жидкость из заторможенного стимуляцией сердца была перенесена на второе нестимулированное сердце, оно также начинало биться медленнее. Было очевидно, что стимуляция блуждающего нерва вызывала освобождение в перфузирующий раствор тормозящего вещества. В последующих экспериментах Леви и его коллеги показали, что ацетилхолин (АХ) полностью воспроизводил эффекты этого вещества.

Удивительно, что идея этого эксперимента пришла Леви во сне, он записал ее, но поутру не смог разобраться в том, что написал ночью. К счастью, сон повторился, и в этот раз Леви не стал рисковать: он помчался в лабораторию и поставил этот эксперимент. Вот как он вспоминает эту ночь:

По серьезному размышлению, в холодных лучах утреннего света, я бы никогда не поставил этого эксперимента. То, что блуждающий нерв может освобождать тормозящее вещество, было очень маловероятно; еще менее вероятным было то, что химическое вещество, которое предположительно должно было действовать на коротком расстоянии между нервным окончанием и мышцей, освобождалось бы в таком большом количестве, что сохраняло бы эффективность после разведения в перфузирующей жидкости[4].

В начале 1930-х годов роль АХ в синаптической передаче в ганглиях вегетативной нервной системы была окончательно установлена Фельдбергом и его сотрудниками[5]. Схожие идеи можно также найти в статьях Дэйла, который на протяжении нескольких десятилетий был одной из ведущих фигур британской физиологии и фармакологии[6]. Среди многих его открытий — выяснение роли ацетилхолина в синапсах в вегетативных ганглиях и установление его роли в нервно-мышечном синапсе.

Химическая синаптическая передача в нервно-мышечном соединении позвоночных

В 1936 году Дэйл и его сотрудники показали, что стимуляция двигательных нервов, иннервирующих скелетную мускулатуру, вызывает освобождение АХ[7]. В дополнение к этому инъекция АХ в артерии, снабжающие мышцу кровью, вызывала мощное синхронное сокращение мышечных волокон. В дальнейшем были использованы электрофизиологические подходы для исследования изменений мембранного потенциала мышечных волокон, вызываемых стимуляцией двигательного нерва, и было показано, что эти изменения могут быть воспроизведены нанесением АХ. Было также показано, что ответы, вызванные стимуляцией нерва и прямым нанесением АХ, блокируются кураре — ядом, которым южноамериканские индейцы смазывали стрелы и который блокирует рецепторы к АХ, и потенциируются эзерином — веществом, которое предотвращает гидролиз АХ ферментом ацетилхолинэстеразой. Эти эксперименты послужили надежным доказательством гипотезы о химической природе синаптической передачи в нервно-мышечном синапсе. Как будет показано далее, высокоспециализированные пре- и постсинаптические образования обеспечивают быструю — в миллисекундном диапазоне — химическую синаптическую передачу. Таким образом, доминировавшая длительное время гипотеза об электрической передаче, которая была общепринята на протяжении около 100 лет и базировалась на неадекватных доказательствах, была наконец отвергнута прямыми экспериментами, но при этом оказалась верной в некоторых других синапсах.

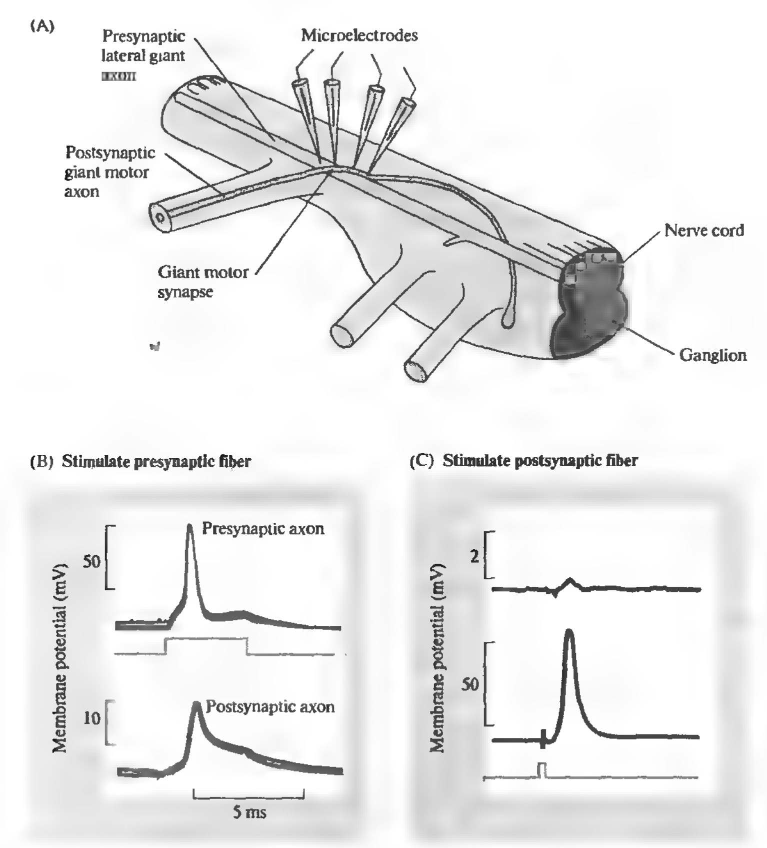


Рис. 9.2. Электрическая синаптическая передача в гигантском синапсе ЦНС рака. (А) Латеральный гигантский аксон образует пресинаптическую часть электрического синапса с постсинаптическим гигантским двигательным аксоном. (В) Деполяризация пресинаптического нерва без какой-либо задержки распространяется на постсинаптическое волокно. В данном примере каждая клетка достигает порога и генерирует потенциал действия. (С) При прямой стимуляции постсинаптического аксона постсинаптический потенциал действия приводит к незначительной деполяризации в пресинаптическом аксоне. Такие синапсы называются выпрямляющими.

Fig. 9.2. Electrical Synaptic Transmission at a Giant Synapse in the crayfish central nervous system. (A) The experimental preparation. The presynaptic lateral giant axon makes an electrical synapse with the postsynaptic giant motor axon in the abdominal nerve cord. (B) Depolarization of the presynaptic axon spreads immediately to the postsynaptic fiber. In this case each cell reaches threshold and fires an action potential. (C) When the postsynaptic axon is stimulated directly to give an action potential, depolarization spreads poorly from the postsynaptic to the presynaptic axon. The synapse is said to rectify. (After Furshpan and Potter, 1959.)

§ 2. Электрическая синаптическая передача

Идентификация и характеристики электрических синапсов

В 1959 году Фурщпан и Поттер, используя внутриклеточные микроэлектроды для отведения активности от нервных волокон в абдоминальном нервном сплетении рака, открыли электрический синапс между нейронами, вовлеченными в рефлекс избегания (рис. 9.2А)[8]. Они показали, что потенциал действия в латеральном гигантском волокне приводит к деполяризации гигантского двигательного волокна посредством протекания тока между этими клетками (рис. 9.2В). Деполяризация была достаточной для того, чтобы запустить в постсинаптическом волокне потенциал действия. Электрическая связь была эффективной только в одном направлении, и деполяризация постсинаптического волок-

на не приводила к пресинаптической деполяризации (рис. 9.2С). Другими словами, этот синапс является выпрямляющим.

В отличие от гигантского синапса рака большинство электрических синапсов не проявляют свойств выпрямления и одинаково хорошо проводят возбуждение в обоих направлениях. Морфологическим субстратом электрической связи в гигантском синапсе рака и в других электрических синапсах являются щелевые контакты (gap junctions)[9]. Щелевые контакты образуются коннексонами, которые дают возможность протекания электрического тока между клетками (глава 7).

Электрическая передача была показана в разнообразных синапсах[10, 11], например, между мотонейронами в спинном мозге лягушки[12], чувствительными нейронами в мезэнцефалическом ядре крысы[13], пирамидными клетками в гиппокампе[14] и горизонтальными клетками в сетчатке зебрарыбки[15]. Интересным свойством электрических контактов между чувствительными нейронами у пиявки является то, что деполяризация проводится через них хорошо, а гиперполяризация — плохо, т. е. эти контакты обладают двойным выпрямлением[16, 17].

Сила взаимодействия между клетками через электрические контакты обычно выражается **коэффициентом связи**. Коэффициент 4 : 1 означает, что в постсинаптической клетке изменение потенциала составляет одну четвертую от изменения потенциала в пресинаптической клетке. Для того, чтобы обеспечить эффективную электрическую связь, необходимо, чтобы сопротивление контактов между клетками было мало, а также необходимо, чтобы пре- и постсинаптические элементы были сопоставимы по своим размерам (глава 7).

Часто электрическая и химическая передача сосуществуют в одном синапсе. Смешанные электрические и химические синапсы были впервые обнаружены в цилиарном ганглии птиц, где химическому синаптическому потенциалу (вызванному ацетилхолином) предшествует потенциал, опосредованный электрическим контактом (рис. 9.3)[18]. Смешанные синапсы часто встречаются у позвоночных, например, на интернейронах спинного мозга[19] и мотонейронах в спинном мозге лягушки[20]. Постсинаптические клетки могут получать раздельные электрические и химические синаптические входы из различных источников. Например, в ганглиях пиявки (глава 15) мотонейроны получают три типа различных синаптических входов от чувствительных нейронов, настроенных на разные модальности; один из входов является химическим, другой — электрическим, а третий — смешанным, электрическим и химическим одновременно[21].

Синаптическая задержка в химических и электрических синапсах

Одним из характерных свойств электрических синапсов является отсутствие синаптической задержки. В химических синапсах около 1 мс разделяет момент прихода импульса в нервное окончание и появление электрического потенциала в постсинаптической клетке. Эта задержка обусловлена тем временем, которое необходимо для освобождения медиатора нервным окончанием (глава 11). В электрическом синапсе такой задержки не существует, и ток немедленно проводится от одной клетки к другой.

Смешанные синапсы с электрической и химической передачей являются удобной моделью для сравнения этих двух механизмов синаптической передачи. На рис. 9.3 приведена запись внутриклеточного отведения от клетки в цилиарном ганглии цыпленка. Стимуляция входящего в ганглий нерва вызывает потенциал действия в постсинаптической клетке с очень короткой задержкой (рис. 9.3А). Если постсинаптический нейрон слегка гиперполяризовать (рис. 9.3В), то потенциал действия возникает позднее, выявляя раннюю кратковременную деполяризацию, которая не достигает порога потенциала действия, поскольку клетка гиперполяризована. Еще бóльшая гиперполяризация (рис. 9.3С) полностью блокирует потенциал действия, выявляя химический синаптический потенциал. Таким образом, в этой клетке в нормальных условиях инициация постсинаптического потенциала действия химической передачей предусиливается электрической связью. В этом примере потенциал электрической связи предшествует химическому потенциалу с интервалом около 2 мс, что позволяет напрямую оценить синаптическую задержку. Дополнительные эксперименты на этих клетках выявили, что электрическая связь является двухсторонней, то есть эти синапсы не являются выпрямляющими.

Электрическая передача обладает рядом преимуществ. Одно из них — то, что электри-

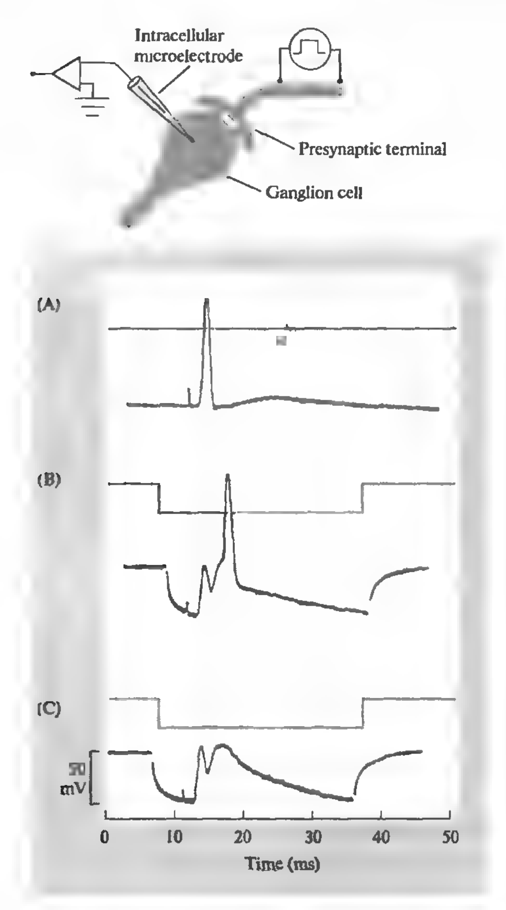


Рис. 9.3. Электрическая и химическая синаптическая передача в цилиарном ганглии цыпленка. (A) Стимуляция входящего в ганглий нерва вызывает потенциал действия в регистрируемом нейроне ганглия. (B) При гиперполяризации нейрона потенциал действия возникает значительно позже, и обнаруживается ранняя кратковременная деполяризация. Эта деполяризация является электрическим синаптическим потенциалом, вызываемым прямым током из пресинаптического окончания в постсинаптический нейрон. На записи, показанной на части A, электрический синаптический потенциал деполяризует клетку до порога и запускает потенциал действия. (C) Еще бóльшая гиперполяризация предотвращает потенциал действия, и выявляется более медленный химический синаптический потенциал. Химический синаптический потенциал следует за электрическим с синаптической задержкой около 2 мс при комнатной температуре.

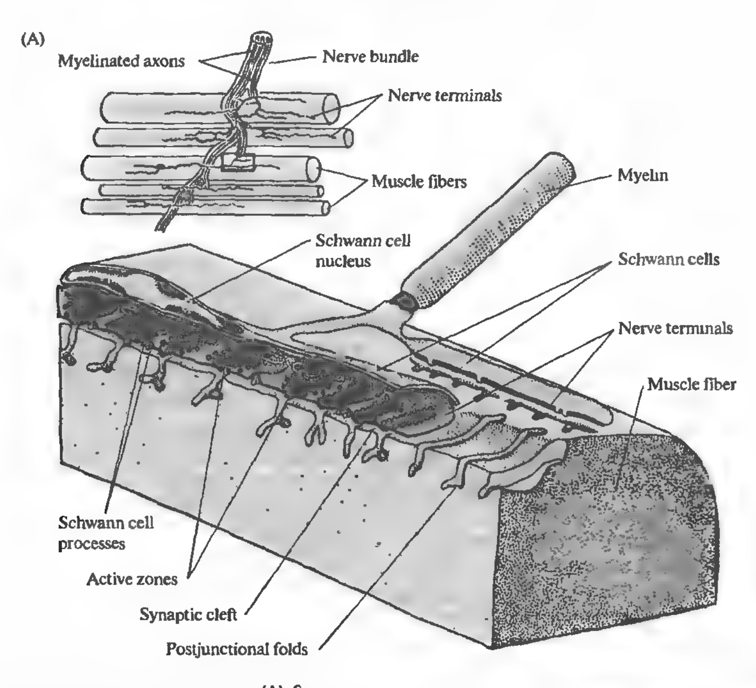
Fig. 9.3. Electrical and Chemical Synaptic Transmission in a chick ciliary ganglion cell, recorded with an intracellular microelectrode. (A) Stimulation of the preganglionic nerve produces an action potential in the ganglion cell (lower trace). (B) When the ganglion cell is hyperpolarized by passing current through the recording electrode (upper trace), the cell reaches threshold later, revealing an earlier, transient depolarization. This depolarization is an electrical synaptic potential (coupling potential), caused by current flow into the ganglion cell from the presynaptic terminal. In A, the electrical synaptic potential depolarized the ganglion cell to threshold, initiating an action potential. (C) Slightly greater hyperpolarization prevents the ganglion cell from reaching threshold, exposing a slower chemical synaptic potential. The chemical synaptic potential follows the coupling potential with a synaptic delay of about 2 ms at room temperature. (After Martin and Pilar, 1963.)

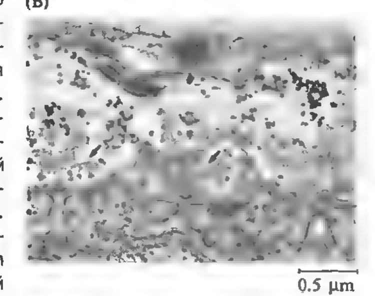
ческие синапсы обладают большей надежностью, чем химические синапсы: они не подвержены синаптической депрессии и не блокируются нейротоксинами[22, 23]. Второе преимущество в большей скорости электрической передачи. Скорость является существенным фактором в быстрых рефлексах избегания, в которых экономия миллисекунды может стать принципиальной для выживания при нападении хищника. Другими функциями электрических синапсов являются синхронизация электрической активности в группах нейронов[24, 25] и межклеточная передача таких молекул, как АТФ, цАМФ и ионов кальция[26]. Было показано, что дофамин может модулировать активность щелевых контактов между клетками в сетчатке[27, 28]. Таким образом, щелевые контакты являются не просто пассивными контактами, но могут также быть динамическим компонентом нейрональных сетей.

§ 3. Химическая синаптическая передача

При попытке воссоздать схему химической синаптической передачи возникает несколько очевидных вопросов (рис. 9.1B). Каким образом происходит освобождение нейромедиатора? Как взаимодействие медиатора с постсинаптическими рецепторами приводит к возбуждению или торможению? Процесс освобождения рассматривается в деталях в главе 11, здесь же будет рассмотрен вопрос о том, как нейромедиатор воздействует на постсинаптическую клетку в прямых химических синапсах.

Многие из пионерских исследований химической синаптической передачи были проведены на сравнительно простых объектах, в частности, на нервно-мышечном соединении лягушки. В то время этот препарат имел то преимущество, что нейромедиатор (АХ)





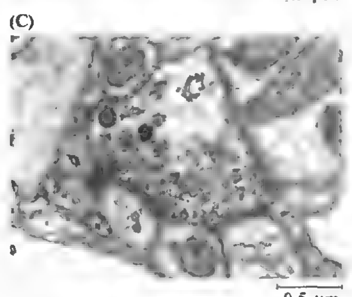


Рис. 9.4. Структура химического синапса. (A) Схема нервно-мышечного соединения лягушки. Синаптические везикулы сгруппированы в нервном окончании в областях, располагающихся напротив постсинаптических складок. Эти области, называемые активными зонами, являются местами, в которых медиатор освобождается в синаптическую щель. (B) Электронная микрофотография продольного среза нервно-мышечного соединения. В пресинаптическом окончании кластеры синаптических везикул располагаются возле уплотнений на пресинаптической мембране — активных зон (отмечены стрелками). На мышечном волокне постсинаптические складки располагаются напротив активных зон. (C) Электронная микрофотография синапса в ЦНС пиявки. Как и в нервно-мышечном соединении лягушки, кластеры синаптических везикул находятся возле электронно-плотных участков на пресинаптической мембране, формируя активные зоны, которые расположены напротив постсинаптических уплотнений.

Fig. 9.4. Structure of Chemical Synapses. (A) A three-dimensional sketch of part of the terminal arbor of a motor axon at the frog skeletal neuromuscular junction. The low-power view (inset) shows several skeletal muscle fibers and their innervation (the region depicted in more detail is indicated by the box). Synaptic vesicles are clustered in the nerve terminal in special regions opposite the openings of the postjunctional folds. These regions, called active zones, are the sites of transmitter release into the synaptic cleft. Fingerlike processes of Schwann cells extend between the terminal and the postsynaptic membrane, separating active zones. (B) Electron micrograph of a longitudinal section through a portion of the neuromuscular junction. In the nerve terminal, clusters of vesicles lie over thickenings in the presynaptic membrane—the active zones (arrows). Schwann cell processes (S) separate the clusters. In the muscle, postjunctional folds open into the synaptic cleft directly under the active zone. The band of fuzzy material in the cleft, which follows the contours of the postjunctional folds, is the synaptic basal lamina. (C) Electron micrograph of synapses in the central nervous system of the leech. As at the frog neuromuscular junction, clusters of synaptic vesicles are focused on dense regions of the presynaptic membrane, forming active zones, and are juxtaposed to postsynaptic densities. (B kindly provided by U. J. McMahan; C kindly provided by K. J. Muller.)

был окончательно установлен. (Много лет спустя было показано, что вместе с АХ двигательные нервные окончания выделяют также АТФ, который действует в качестве второго нейромедиатора[29].)

Структура синапса

Химические синапсы имеют сложную структуру. На рис. 9.4 показаны морфологические свойства нервно-мышечного соединения лягушки. Одиночные аксоны ответвляются от входящего двигательного нерва, теряют свою миелиновую оболочку и заканчиваются нервными окончаниями, которые располагаются в желобках на поверхности мышечного волокна. Синаптическая щель, разделяющая нервное окончание и мышечную мембрану, составляет около 30 нм. Внутри щели находится базальная мембрана, которая повторяет рельеф поверхности мышечного волокна. Постсинаптические складки располагаются на мышечном волокне через равные интервалы. Складки являются особенностью скелетных мышц, но не являются общим свойством всех химических синапсов. Постсинаптический участок на мышечном волокне известен как двигательная концевая пластинка. Шванновская клетка покрывает нервное окончание, охватывая его напоминающими пальцы отростками через равные интервалы.

В цитоплазме нервного окончания находятся кластеры синаптических везикул, связанных с электронно-плотным материалом на пресинаптической мембране, что формирует активные зоны. Синаптические везикулы являются местом хранения АХ; при возбуждении нервного окончания они сливаются с пресинаптической мембраной в активной зоне и освобождают свое содержимое в синаптическую щель путем экзоцитоза (глава 11)[30].

Синапсы на нервных клетках обычно образуются расширениями нервного окончания, называемыми бутонами, которые также отделены от постсинаптической мембраны синаптической щелью. На пресинаптической мембране бутонов обнаруживаются участки с повышенной электронной плотностью, к которым прилегают кластеры синаптических везикул, формируя активные зоны, сходные с таковыми в нервно-мышечном соединении, но значительно меньших размеров (рис. 9.4С). Бутоны контактируют со всеми участками нервных клеток — дендритами, телом клетки и аксоном. На дендритах многие синаптические входы располагаются на маленьких шипиках (spines), отходящих от основного дендрита. Постсинаптическая мембрана в синапсах между нейронами часто истончена и содержит электронно-плотный материал.

Синаптические потенциалы в нервно-мышечном соединении

В ранних работах Экклса, Катца и Куффлера для исследования потенциала концевой пластинки (ПКП) использовались внеклеточные методы регистрации[31,32]. ПКП — это деполяризация мышечного волокна в участке концевой пластинки, которая следует за возбуждением двигательного нерва и вызывается АХ, освобождающимся из пресинаптических нервных окончаний. Синаптические потенциалы, напоминающие ПКП, наблюдаются также в нейронах. Синаптический потенциал, возбуждающий постсинаптическую клетку, обычно называется возбуждающим постсинаптическим потенциалом (ВПСП), а тормозящий — тормозным постсинаптическим потенциалом (ТПСП).

Амплитуда ПКП в скелетном мышечном волокне в нормальных условиях значительно больше, чем требуется для инициации потенциала действия. Однако, при добавлении в наружный раствор кураре (около 1 мкмоль), амплитуда ПКП уменьшается до подпороговых значений и потенциал действия не возникает (рис. 9.5). Эффект кураре зависит от концентрации, и при дальнейшем ее увеличении ПКП подавляется полностью.

С помощью внутриклеточных электродов[33] Фетт и Катц[34] исследовали временной ход и пространственное распределение ПКП в мышечных волокнах, обработанных кураре. Они стимулировали двигательный нерв и регистрировали ПКП внутриклеточно на разных расстояниях от концевой пластинки (рис. 9.6). В концевой пластинке деполяризация быстро достигала максимума и затем медленно спадала в течение 10–20 мс. При удалении регистрирующего электрода от области концевой пластинки амплитуда ПКП прогрессивно уменьшалась, а время роста ПКП замедлялось. Фетт и Катц показали, что по достижении пика амплитуда ПКП спадает со скоростью, соответствующей постоянной времени мембраны мышечного волокна, и что уменьшение амплитуды ПКП с удалением от концевой пластинки объясняется кабельными свойствами мышечного

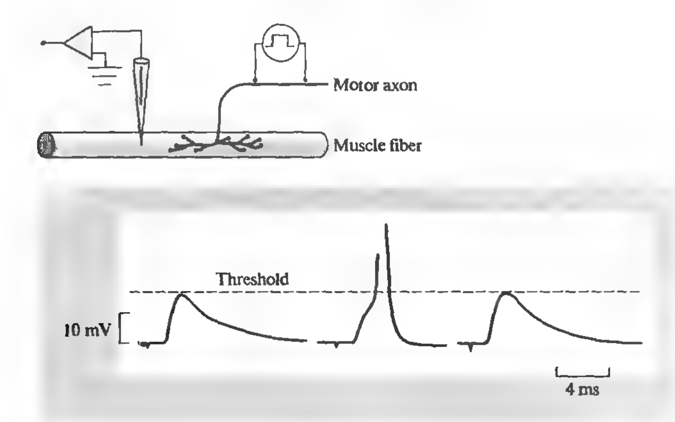


Рис. 9.5. Синаптические потенциалы, регистрируемые внутриклеточным микроэлектродом в нервно-мышечном соединении, обработанном кураре. Концентрация кураре была подобрана таким образом, чтобы амплитуда синаптического потенциала лишь изредка достигала порога потенциала действия в мышечном волокне.

Fig. 9.5. Synaptic Potentials recorded with an intracellular microelectrode from a mammalian neuromuscular junction treated with curare. The curare concentration in the bathing solution was adjusted so that the amplitude of the synaptic potential was near threshold and so on occasion evoked an action potential in the muscle fiber. (From Boyd and Martin, 1956.)

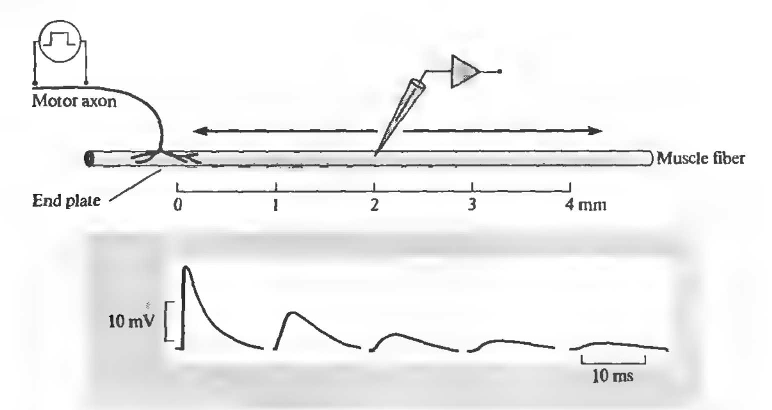


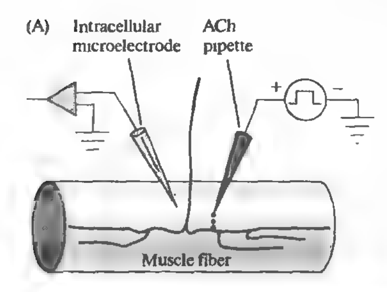
Рис. 9.6. Уменьшение амплитуды синаптических потенциалов по мере удаления от концевой пластинки мышечного волокна. При удалении регистрирующего электрода от концевой пластинки регистрируемые с помощью внутриклеточного электрода синаптические потенциалы уменьшаются в амплитуде, а время их нарастания увеличивается.

Fig. 9.6. Decay of Synaptic Potentials with Distance from the end plate region of a muscle fiber. As the distance from the end plate increases, synaptic potentials recorded by an intracellular electrode decrease in size and rise more slowly. (After Fatt and Katz, 1951.)

волокна. Соответственно, они сделали вывод о том, что ПКП генерируется кратковременным импульсом тока, который входит в мышечное волокно в области концевой пластинки и вызывает быструю деполяризацию. Вызванный этим током потенциал спадает пассивно, распространяясь от концевой пластинки в обоих направлениях, и постепенно затухает.

Определение участков мышечного волокна, чувствительных к АХ

Особые свойства скелетного мышечного волокна в участке его иннервации были известны с начала двадцатого века. Так, Лэнгли[35] предположил наличие «рецептивной субстанции» около двигательных нервных окончаний, основываясь на том, что этот участок



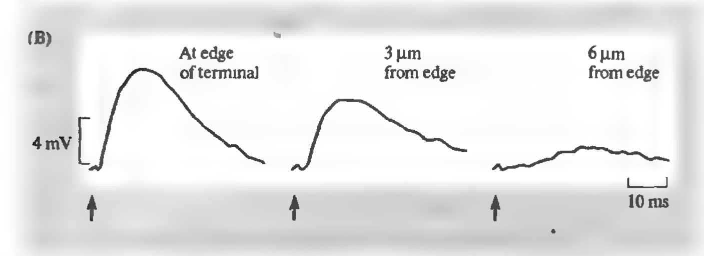


Рис. 9.7. Определение чувствительности к АХ в области нервно-мышечного соединения лягушки с помощью ионофореза. (А) Заполненная АХ пипетка располагается около нервно-мышечного соединения, и АХ освобождается из нее короткими положительными толчками потенциала (ионофорез). Ответы мышечного волокна на аппликацию АХ регистрируются внутриклеточным электродом. (В) Ответы на ионофоретическую аппликацию АХ уменьшаются по мере удаления аппликирующей пипетки от нервного окончания.

Fig. 9.7. Mapping the Distribution of ACh Sensitivity by Ionophoresis at the frog neuromuscular junction. (A) An ACh-filled pipette is placed close to the neuromuscular junction, and ACh is ejected from the tip by a brief, positive, voltage pulse (ionophoresis). An intracellular microelectrode is used to record the response from the muscle fiber. (B) Responses to small ionophoretic pulses of ACh applied at different distances from the axon terminal (indicated by the black dots in [A]). The amplitude and rate of rise of the response decrease rapidly as ACh is applied farther from the terminal. (After Peper and McMahan, 1972.)

мышечного волокна обладает повышенной чувствительностью к различных химическим веществам, например, к никотину. Вскоре после введения в обиход стеклянных микроэлектродов для внутриклеточной регистрации, микроэлектроды стали использоваться также для локальной аппликации АХ (а впоследствии и других веществ) на концевую пластинку мышечного волокна[36]. Этот методический прием проиллюстрирован на рис. 3А.

Микроэлектрод вводится в концевую пластинку мышечного волокна для регистрации мембранного потенциала, в то же время к мышечному волокну подводится микропипетка, заполненная АХ. Аппликация АХ из пипетки производится коротким положительным толчком потенциала, что вызывает выход из пипетки положительно заряженных ионов АХ. Метод подачи заряженных молекул из пипетки называется ионофорезом. Используя этот метод аппликации, Кастильо и Катц показали, что АХ деполяризует мышечное волокно только в области концевой пластинки и только при нанесении его снаружи мышечного волокна[37]. Когда пипетка, заполненная АХ, находится вплотную к концевой пластинке, ионофоретическая аппликация вызывает быстрые ответы (рис. 3В). Удаление пипетки всего на несколько микрометров вызывает уменьшение амплитуды и замедление ответов.

Теперь известно, что постулированной Лэнгли рецептивной субстанцией является никотиновый ацетилхолиновый рецептор. Техника ионофореза позволила с высокой точностью определить распределение постсинаптических рецепторов АХ на мышечных волокнах[38] и нервных клетках[39]. Этот метод оказался особенно полезен в тонких препаратах, в которых пре- и постсинаптические структуры можно различить с помощью интерференционного контраста[40] и положение ионофоретической пипетки по отношению к синапсу может быть определено с высокой точностью.

Одним из таких препаратов является нервно-мышечное соединение змеи, показанное на рис. 9.8. Концевые пластинки в мышцах змеи имеют около 50 мкм в диаметре, напоминая по своей компактности концевые пластинки у млекопитающих. Каждое окончание аксона содержит 50–70 утолщений, аналогичных синаптическим бутонам, из которых выделяется медиатор. Электронная микрофотография такого синапса показана на рис. 9.8В, а на рис. 9.8С приведена электронная микрофотография типичной микропипетки для ионофореза. Размер отверстия в кончике составляет примерно 50 нм, что сравнимо с размером синаптической везикулы.

Особенно удачным препаратом для исследования чувствительности разных участков

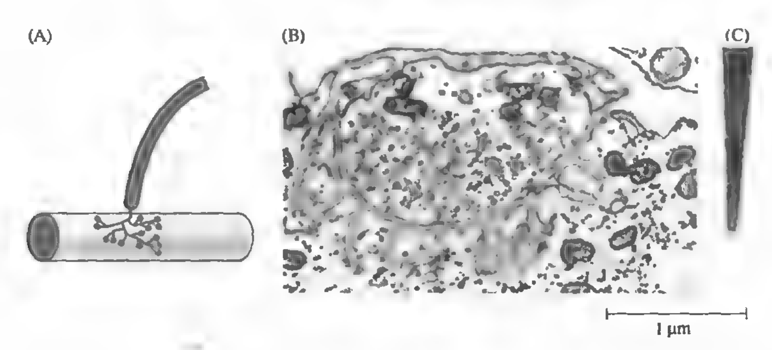


Рис. 9.8. Нервно-мышечное соединение змеи. (A) Концевая пластинка на скелетной мышце змеи. Аксон заканчивается в виде кластера пресинаптических бутонов. (B) Электронная микрофотография поперечного среза одного из бутонов. Синаптические везикулы, посредством которых АХ освобождается из нервного окончания, имеют диаметр около 50 нм. (C) Электронная микрофотография кончика пипетки для ионофоретической аппликации АХ, сделанная при таком же увеличении, что и на (B). Пипетка имеет внешний диаметр около 100 нм и внутренний диаметр около 50 нм.

Fig. 9.8. Skeletal Neuromuscular Junction of the Snake. (A) An end plate on a skeletal muscle of a snake. The axon terminates in a cluster of boutons. (B) Electron micrograph of a cross section through a bouton. Synaptic vesicles, which mediate ACh release from the nerve terminal, are 50 nm in diameter. (C) Electron micrograph of the tip of a micropipette used for ionophoresis of ACh, shown at the same magnification as (B). The pipette has an outer diameter of 100 nm and an opening of about 50 nm. (From Kuffler and Yoshikami, 1975.)

мышечного волокна к АХ является препарат, в котором двигательное нервное окончание удалено после обработки мышцы ферментом коллагеназой[41, 42]. Процесс удаления окончаний показан на рис. 9.9A. На месте каждого из бутонов остается круглый кратер, дном которого является постсинаптическая мембрана. На рис. 9.9B показана пипетка, заполненная АХ, нацеленная на один из таких кратеров. Если пипетка находится непосредственно над постсинаптической мембраной, то электрический заряд в 1 пК (пикокулон) вызывает освобождение АХ, приводящее к деполяризации мышечного волокна на 5 мВ. Чувствительность мембраны таким образом составляет 5 000 мВ/нК (рис. 9.9C). Удаление пипетки всего на 2 микрона от границы кратера вызывает ответ в 50–100 раз слабее. На границах между кратерами чувствительность значительно варьирует.

Другие способы для определения распределения рецепторов АХ

Другой способ для определения того, каким образом рецепторы АХ распределены по поверхности мышечного волокна, основан на связывании α-бунгаротоксина — токсина, содержащегося в змеином яде и связывающегося избирательно и необратимо с никотиновыми АХ рецепторами. Распределение связывания токсина можно наблюдать с использованием гистохимических методик. Например, флуоресцентные метки могут быть связаны с α-бунгаротоксином, и распределение рецепторов может быть исследовано с помощью флуоресцентного микроскопа[43] (рис. 9.10A). α-Бунгаротоксин может быть также связан с ферментом пероксидазой хрена, и плотный продукт реакции визуализован в электронном микроскопе[44] (рис. 9.10B). Эти эксперименты подтверждают, что рецепторы сконцентрированы непосредственно под окончанием аксона. Еще более точная количественная оценка концентрации АХ рецепторов может быть получена с использованием радиоактивного α-бунгаротоксина и авторадиографии (рис. 9.10C)[45]. Плотность рецепторов может быть определена путем подсчета количества гранул серебра в экспонированной эмульсии. Плотность рецепторов наибольшая на перегибах и верхней трети постсинаптических складок (около 10^4/мкм^2); в экстрасинаптических участках плотность значительно меньше (около 5/мкм^2)[46]. Рецепторы сконцентрированы на постсинаптической мембране также в синапсах центральной и периферической нервной системы.

Нейромедиаторы и другие вещества могут подаваться на нейроны и мышечные волокна также толчками давления, подаваемыми на кончик пипетки. Преимуществом этого метода является то, что им можно подавать

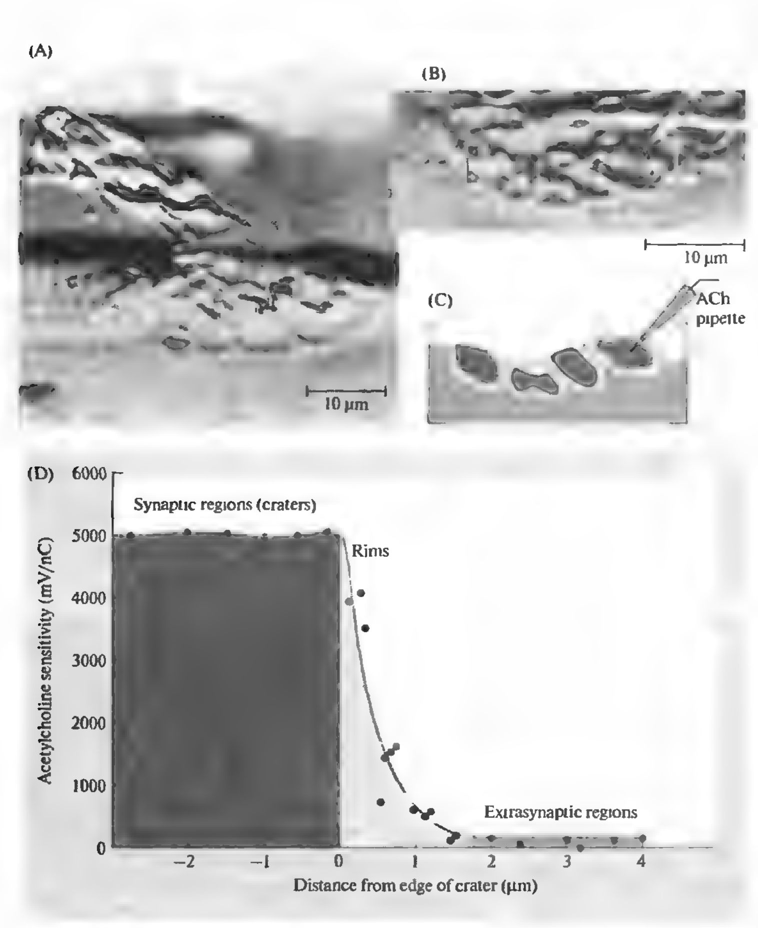


Рис. 9.9. Распределения АХ-рецепторов в нервно-мышечном соединении змеи. (A) Удаление нервного окончания с поверхности мышечного волокна после обработки коллагеназой. (B) Постсинаптическая мембрана после удаления нервного окончания. Заполненная АХ пипетка (справа) нацелена на один из кратеров, в котором до этого находился пресинаптический бутон. (C) Рисунок области, обозначенной скобками на части (B), с изображением четырех кратеров, в которых раньше находились пресинаптические бутоны. Центральная часть кратера, обозначенная более темным цветом, является постсинаптической мембраной, вокруг нее (светлым) — края кратера, за которыми ниже находится экстрасинаптическая область, обозначенная переходным (между темным и светлым) серым цветом. (D) Распределение чувствительности к АХ. Кратеры имеют самую высокую чувствительность к АХ (5 000 мВ/нК); на краях кратеров чувствительность постепенно снижается и в экстрасинаптической области составляет всего около 100 мВ/нК.

Fig. 9.9. Acetylcholine Receptor Distribution at the skeletal neuromuscular junction of the snake. (A) Light micrograph showing the removal of the nerve terminal from the neuromuscular junction in a muscle treated with collagenase. (B) Light micrograph of the postsynaptic surface of the muscle cell exposed by removal of the nerve terminal. An ACh-filled pipette (entering from upper right; compare with part C) points to a crater that had been occupied by a terminal bouton. (C) Drawing of the area bracketed in B, showing the position of four craters formerly occupied by terminal boutons. Dark areas represent postsynaptic membrane within the craters, light areas are the crater rims, and grey areas are extrasynaptic regions. (D) Distribution of ACh sensitivity. The craters have a uniformly high sensitivity to ACh (5 000 mV/nC); the sensitivity declines steeply at the rims of the craters; extrasynaptic regions have a uniformly low ACh sensitivity (100 mV/nC). (After Kuffler and Yoshikami, 1975.)

электрически нейтральные молекулы. Вещества могут также подаваться на клетки или участки мембран с использованием методики очень быстрой замены растворов заданного состава[47].

Измерение ионных токов, вызванных АХ

Каким образом АХ вызывает входящий ток в концевой пластинке? Эксперименты, прове-

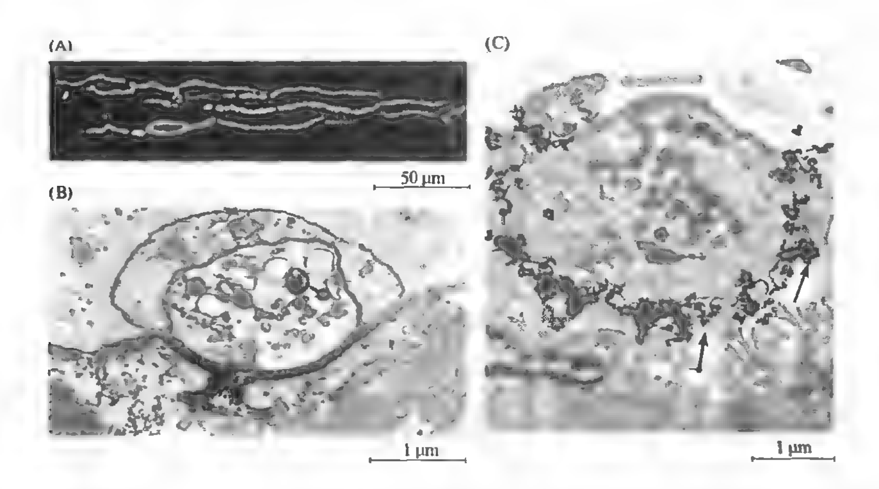
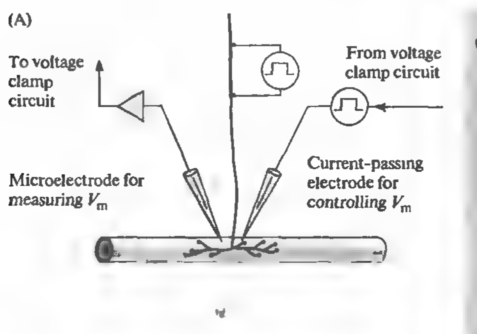


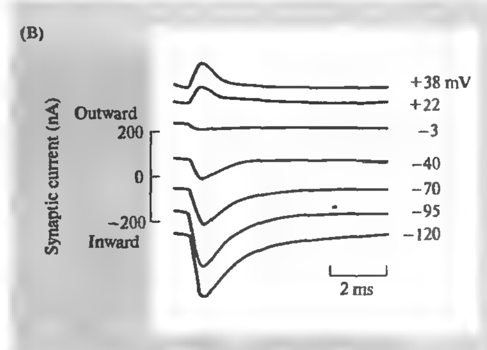
Рис. 9.10. Визуализация распределения АХ рецепторов в нервно-мышечном соединении. (A) Флуоресцентная микрофотография кожно-грудной мышцы лягушки, окрашенной α-бунгаротоксином, связанным с родамином. (B) Электронная микрофотография поперечного среза нервно-мышечного соединения кожно-грудинной мышцы, окрашенного α-бунгаротоксином, связанным с пероксидазой хрена. Электронно-плотный продукт реакции заполняет всю синаптическую щель. (C) Авторадиограмма нервно-мышечного соединения, окрашенного $[^{125}I]$-α-бунгаротоксином. Серебряные гранулы, отмеченные стрелками, сконцентрированы на верхней части постсинаптических складок.

Fig. 9.10. Visualizing the Distribution of ACh Receptors at the neuromuscular junction. (A) Fluorescence micrograph of a frog cutaneous pectoris muscle fiber stained with rhodamine a-bungarotoxin. (B) Electron micrograph of a cross section of a frog cutaneous pec-toris neuromuscular junction labeled with HRP-a-bungarotoxin. Dense reaction product fills the synaptic cleft. (C) Autoradiograph of a neuromuscular junction in a lizard intercostal muscle labeled with $[^{125}I]$-α-bungarotoxin. Silver grains (arrows) show that receptors are concentrated at the tops and along the upper third of the junctional folds. (A kindly provided by W. J. Betz; B kindly provided by U. J. McMahan; C from Salpeter, 1987, kindly provided by M. M. Salpeter.)

денные Феттом и Катцем, позволили сделать вывод о том, что АХ вызывает значительное неспецифическое увеличение проводимости постсинаптической мембраны для маленьких ионов[33)]. Две методики были использованы для исследования изменения проводимости, вызываемой АХ. В одной из них использовались радиоактивные изотопы и было показано, что возрастает проводимость ионов натрия, калия и кальция, но не хлора[48)]. Этот эксперимент является убедительным доказательством тому, какие ионы вовлечены в изменение проводимости, но не дает информации о деталях этих изменений, их кинетике или потенциалзависимости. Эта информация была впервые получена А. Такеуши и Н. Такеуши, которые использовали метод двухэлектродной фиксации мембранного потенциала в мышечных волокнах[49)]. Дизайн этого эксперимента изображен на рис. 9.11А. Два микроэлектрода вводятся в область концевой пластинки мышечного волокна лягушки — один из их регистрирует мембранный потенциал (V_m), а через другой пропускается ток для фиксации потенциала на заданном уровне. Постсинаптические рецепторы активируются либо АХ, освобождаемым из двигательного нерва, либо путем прямой ионофоретической аппликации. Впоследствии схожие эксперименты были проведены[50)] на мышечных волокнах, обработанных глицерином, что предотвращает сокращение мышечного волокна при его деполяризации, но имеет также и тот недостаток, что мышечные волокна находятся в искусственно деполяризованном состоянии.

Результаты, полученные на обработанном глицерином мышечном волокне, показаны на рис. 9.11В. При мембранном потенциале, фиксированном на уровне −40 мВ, стимуляция нерва вызывает входящий ток, который вызвал бы деполяризацию мышечного волокна в том случае, если бы потенциал мышечного волокна не фиксировался. При более отрицательных потенциалах ток через конце-





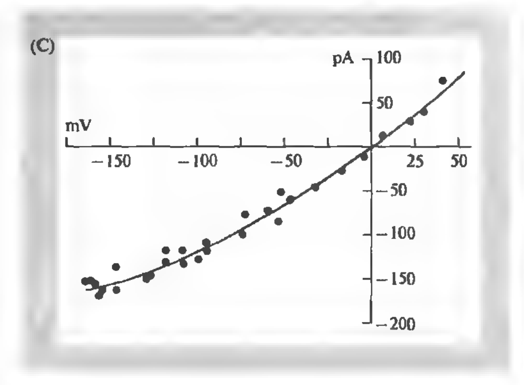


Рис. 9.11. Потенциал реверсии синаптических токов, измеренный в условиях фиксации потенциала. (A) Схема регистрации токов двигательной концевой пластинки в условиях фиксации потенциала. (B) Синаптические токи, зарегистрированные при мембранных потенциалах от −120 до +38 мВ. При отрицательных значениях мембранного потенциала синаптические токи имеют входящее направление. Если мембранный потенциал не фиксировать, то входящий ток приведет к деполяризации мышечного волокна. При положительных значениях мембранного потенциала синаптические токи направлены из клетки наружу. (C) Зависимость амплитуды синаптического тока от мембранного потенциала близка к линейной и потенциал реверсии синаптических токов находится около 0 мВ.

Fig. 9.11. Reversal Potential for Synaptic Currents measured by voltage clamp recording. (A) Scheme for voltage clamp recording at the motor end plate. (B) Synaptic currents recorded at membrane potentials between −120 and +38 mV. When the muscle membrane potential is clamped below 0 mV, synaptic current flows into the muscle. Such inward current would depolarize the muscle if it were not voltage-clamped. When the end plate potential is clamped above 0 mV, synaptic current flows out of the cell. (C) Plot of peak end plate current as a function of membrane potential. The relation is nearly linear, with the reversal potential close to 0 mV. (After Magleby and Stevens, 1972.)

вую пластинку увеличивался, а при деполяризации мембраны — уменьшался. При еще большей деполяризации токи меняли направление и становились выходящими.

Зависимость амплитуды тока концевой пластинки от мембранного потенциала показана на рис. 9.11C. Ток реверсирует, т. е. меняет направление со входящего на выходящий около 0 мВ на постсинаптической мембране. Значение мембранного потенциала, при котором происходит реверсия тока, называется потенциалом реверсии (V_r). В более ранних экспериментах потенциал реверсии составил около −15 мВ[51].

Почему важно знать потенциал реверсии?

Потенциал реверсии тока концевой пластинки дает информацию об ионных токах, которые протекают через каналы, активируемые АХ на постсинаптической мембране. Например, если бы каналы были проницаемы только для ионов натрия, то ток через эти каналы реверсировал бы при натриевом равновесном потенциале (около +50 мВ). Другие основные ионы, калий и хлор, имеют равновесный потенциал около −90 мВ, что близко к потенциалу покоя (глава 5); равновесный потенциал для ионов кальция составляет примерно +120 мВ. Ни один из этих ионов не имеет равновесный потенциал в диапазоне от 0 до −15 мВ. Какие же ионы вовлечены в генерацию этих ответов? А. Такеуши и Н. Такеуши показали, что изменение наружной концентрации натрия, калия и кальция приводит к изменению потенциала реверсии, а изменение концентрации ионов хлора на нее не влияет, что согласуется с результатами с исполь-

зованием радиоактивных изотопов[33, 52]. Таким образом, был сделан вывод о том, что АХ вызывает общее увеличение катионной проводимости.

Сравнительный вклад натрия, калия и кальция в потенциал концевой пластинки

АХ открывает ионные каналы в мембране концевой пластинки, которые при потенциале покоя позволяют ионам натрия и кальция входить, а ионам калия выходить из клетки в соответствии с их электрохимическими градиентами. Поскольку проводимость кальция через каналы сравнительно мала, вкладом ионов кальция в синаптический ток можно пренебречь, так же как и вкладом других ионов, как, например, магния. (Следует заметить, что низкая кальциевая *проводимость* связана с низкой внутри- и внеклеточной концентрацией кальция, в то время как кальциевая *проницаемость* составляет примерно 20 % натриевой проницаемости.) Соответствующая электрическая схема приведена на рис. 9.12А. В покое мембрана состоит из обычных натриевых, калиевых и хлорных каналов. Параллельно к ним соединены активируемые АХ натриевые и калиевые каналы, Δg_{Na} и Δg_K. А. и Н. Такеуши установили, что потенциал реверсии $V_r = -15$ мВ, и что соотношения изменений проводимости $\Delta g_{Na}/\Delta g_K$ составляет около 1,3. В действительности канал, открываемый АХ, имеет примерно одинаковую проницаемость для ионов натрия и калия[53)–54)]. Однако, если принять по внимание внутри- и внеклеточную концентрацию этих ионов, то оказывается, что количество ионов натрия, доступных для перемещения через канал, превышает количество ионов калия (глава 5). Таким образом, при равном изменении проницаемости, натриевая проводимость несколько больше (глава 2).

Проводимость мембраны в покое и амплитуда синаптического потенциала

Электрическая схема, показанная на рис. 9.12А, может быть упрощена, если представить мембрану в состоянии покоя как единую проводимость, g_{rest} (равную сумме всех ионных проводимостей), и одну электрическую батарейку, V_{rest} (равную мембранному потенциалу покоя). Синаптическая мембрана может быть представлена одной проводимостью Δg_s и батарейкой с потенциалом V_r (рис. 9.12В). Свойством этой электрической схемы является то, что амплитуда синаптического потенциала зависит как от Δg_{rest}, так и от Δg_s.

Для простоты давайте рассмотрим, какой потенциал образуется в том случае, если синаптическая проводимость активируется на длительное время. Если Δg_s намного больше, чем g_{rest}, то мембранный потенциал должен приблизится к V_r. Если Δg_s равно g_{rest}, то изменение мембранного потенциала, вызванное активацией синаптической проводимости, должно быть вдвое меньше. Таким образом, амплитуда синаптического потенциала может увеличиваться либо при увеличении синаптической проводимости (т. е. при активации большего количества синаптических каналов), либо при уменьшении проводимости мембраны в состоянии покоя. Уменьшение мембранной проводимости является важным механизмом модуляции эффективности синаптической передачи. Например, определенные входы на клетки вегетативного ганглия жабы вызывают закрывание калиевых каналов, что приводит к возрастанию амплитуды возбуждающих синаптических потенциалов, вызываемых другими входами на эти клетки (глава 16).

Кинетика токов через одиночные каналы, активируемые АХ

В какой степени временной ход токов концевой пластинки отражает поведение одиночных ионных каналов, активируемых АХ? Можно представить, что отдельные каналы многократно открываются и закрываются во время тока концевой пластинки с уменьшающейся со временем вероятностью открывания канала. Возможно и то, что каналы открываются лишь один раз, и временной ход интегрального тока определяется тем, как долго каналы остаются в открытом состоянии.

Окончательный ответ на этот вопрос был получен с внедрением методики пэтч-кламп (patch clamp), с помощью которой можно регистрировать активность одиночных ионных каналов (глава 2)[55)]. Было показано, что, при непрерывной аппликации АХ, каналы открываются и закрываются по принципу «все или ничего», причем время нахождения каналов в открытом состоянии соответствует длительности токов концевой пластинки[56)]. Актива-

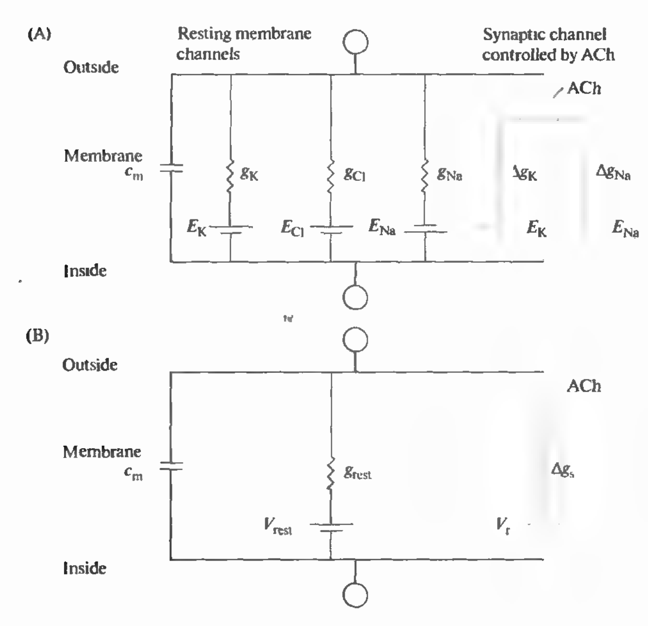


Рис. 9.12. Электрическая модель постсинаптической мембраны. Каналы, активируемые АХ, параллельно соединены с другими каналами и с емкостью мембраны. (А) Синаптические каналы, открываемые АХ, можно представить на схеме как две независимых проводимости для ионов натрия и калия. Другими каналами, открытыми в состоянии покоя, являются калиевые, натриевые и хлорные каналы. (В) Синаптические каналы можно представить в виде одной проводимости с проводимостью Δg_s и электрической батареей с потенциалом, равным потенциалу реверсии V_r. Остальная мембрана может быть представлена в виде единой проводимости g_{rest} и батареей с потенциалом V_{rest}.

Fig. 9.12. Electrical Model of the Postsynaptic Membrane with channels activated by ACh in parallel with the resting membrane channels and with the membrane capacitance, c_m. (A) The synaptic channel opened by ACh is electrically equivalent to two independent pathways for sodium and potassium. The resting membrane has channels for potassium, chloride, and sodium. (B) The synaptic channel can be represented as a single pathway with conductance Δg_s and a battery equal to the reversal potential V_r. The resting membrane can be represented as a single pathway with conductance g_{rest} and a battery equal to V_{rest}.

ция ионного канала может быть описана следующей схемой, в которой молекула медиатора А (агонист) взаимодействует с молекулой постсинаптического рецептора R:

$$2A + R \rightleftharpoons A_2R \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\rightleftharpoons}} A_2R^* .$$

Две молекулы АХ связываются с каналом (по одной молекуле АХ с каждой α-субъединицей; глава 3), который затем подвергается конформационной перестройке из закрытого (A_2R) в открытое (A_2R^*) состояние. Переходы между открытым и закрытым состояниями характеризуются константами α и β, как обозначено на схеме. Теперь рассмотрим временной ход тока концевой пластинки (рис. 9.13). Выделенный из нервного окончания АХ практически одновременно открывает большое количество каналов. Поскольку АХ быстро удаляется из синаптической щели (в результате гидролиза холинэстеразой и диффузии), каждый канал открывается только один раз. Закрывание ионных каналов приводит к спаду синаптического тока. Таким образом, временной ход спада синаптического тока отражает скорость, с которой закрываются одиночные каналы, активируемые АХ. Каналы закрываются со скоростью $\alpha \times [A_2R^*]$; то есть многие каналы закрываются очень быстро, и все меньше и меньше каналов закрывается через большее время (рис. 9.13). Как в случае всех независимых или случайных событий, открытые времена имеют экспоненциальное распределение, со средним временем открытого состояния (τ), равным постоянной времени спада тока концевой пластинки, $1/\alpha$.

Эксперименты с использованием пэтч-кламп методики позволили выявить многие особенности активности каналов, которые невозможно было определить ранее с использованием других методик. Так, местные анестетики (например, прокаин) продлевают спад токов концевой пластинки (в дополнение к блокированию натриевых каналов и потенциалов действия). Пэтч-кламп регистрация позволила определить, что замедление синаптических токов происходит в результате того, что в присутствии прокаина ток через канал трансформируется во вспышки кратковременных открываний. Это происходит, по видимому, вследствие того, что молекула анестетика быстро перемещается внутрь канала и обратно, вызывая кратковременное блокирование тока через канал[57)—59)]. Последующие эксперименты выявили, что, в дополнение к этому механизму блокирова-

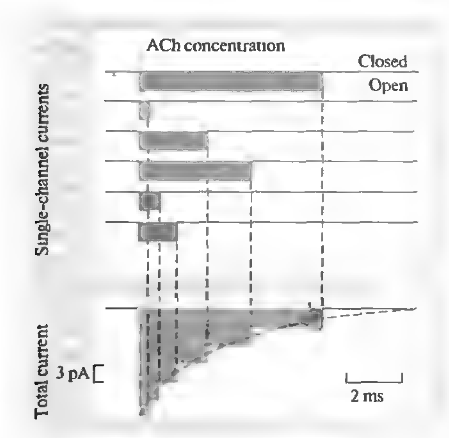


Рис. 9.13. Ток концевой пластинки является результатом сложения токов через одиночные ионные каналы. В верхней части рисунка изображен ток через шесть одиночных каналов. При активации АХ каналы открываются одновременно. АХ быстро гидролизуется, что предотвращает повторную активацию каналов. Распределение времен открытого состояния каналов имеет экспоненциальный характер. На нижней части показан интегральный ток концевой пластинки, который является результатом сложения токов через одиночные каналы; постоянная времени спада интегрального тока равна среднему времени открытого состояния одиночных каналов.

Fig. 9.13. Total End Plate Current Is the Sum of Individual Channel Currents. Current flow through six individual channels is depicted in the top panel. Channels open instantaneously in response to ACh. ACh is rapidly hydrolyzed, preventing any further channel openings. Channel open times are distributed exponentially. The individual channel currents sum to give the total end plate current (lower panel). The time constant of the decay of the total current is equal to the mean open time of the individual channels.

ния канала, прокаин также ингибирует открывание канала, связываясь с рецептором вне устья канала[60]. Свойства канала могут изменяться под действием многих веществ, включая кокаин[61], барбитураты[62], стероидные гормоны[63], общие анестетики[64], которые связываются с местами как внутри, так и вне поры ионного канала.

Свойства рецепторов АХ меняются в процессе развития. Существует эмбриональная форма рецептора АХ, которая имеет низкую проводимость и длительное время открытого состояния, и взрослая форма, которая имеет большую проводимость и короткое время открываний[65, 66]. Переход из эмбриональной формы во взрослую происходит в результате изменения субъединичного состава (главы 3 и 23), а сплайс-варианты одной из эмбриональных субъединиц могут быть ответственны за вариации во времени открытого состояния каналов на ранних этапах развития[67].

§ 4. Прямое синаптическое торможение

В основе работы синапсов, обеспечивающих **прямое химическое торможение**, лежат те же механизмы, что и в основе работы прямых химических возбуждающих синапсов. Возбуждение происходит при открывании в постсинаптической мембране каналов с потенциалом реверсии более положительным, чем порог потенциала действия. В то же время прямое химическое синаптическое торможение достигается открыванием каналов, чей потенциал реверсии отрицателен по отношению к пороговым значениям. Прямое химическое синаптическое торможение происходит при активации каналов, проводящих ионы хлора. Как правило, ионы хлора имеют равновесный потенциал, равный или близкий к потенциалу покоя. Первые исследования прямой химической синаптической передачи были проведены на нервно-мышечном соединении членистоногих[68, 69], рецепторе растяжения рака[70] и мотонейронах спинного мозга кошки[71].

Потенциал реверсии тормозных потенциалов

Мотонейроны спинного мозга тормозятся сенсорными входами от мышц-антагонистов через тормозные интернейроны спинного мозга. Эффект активации тормозных входов может быть исследован в эксперименте, проиллюстрированном на рис. 9.14А. В мотонейрон вводятся два микроэлектрода: один из них используется для регистрации мембранного потенциала, другой — для пропускания тока через клеточную мембрану. При потенциале покоя (около −75 мВ) стимуляция тормозных входов вызывает небольшую гиперполяризацию клетки — **тормозный постсинаптический потенциал** (ТПСП, рис. 9.14В). Если деполяризовать мембрану, пропуская положительный ток в клетку, амплитуда ТПСП увеличивается. При гиперполяризации клетки

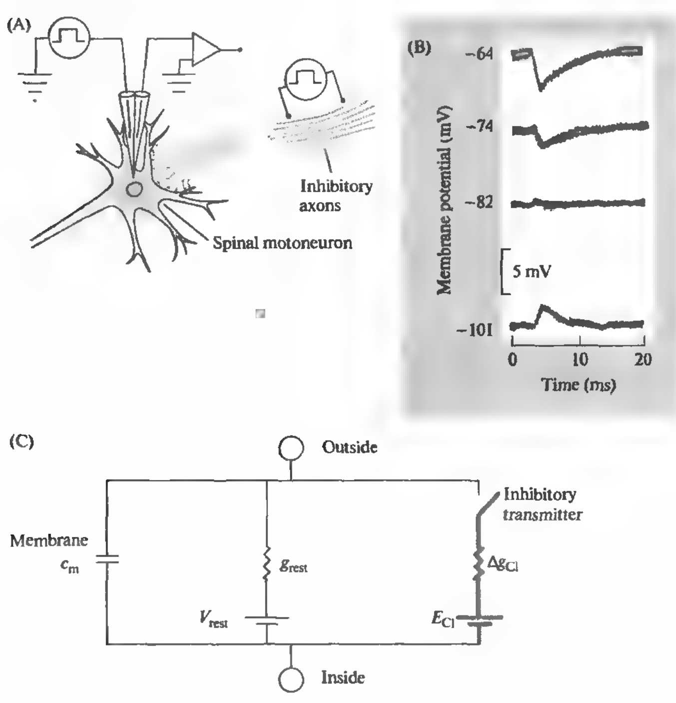


Рис. 9.14. Прямая тормозная химическая синаптическая передача. (A) Схема внутриклеточной регистрации от мотонейрона спинного мозга кошки и стимуляции тормозных синаптических входов. (B) Синаптические потенциалы, вызываемые стимуляцией тормозных входов, записанные при значениях мембранного потенциала между −64 и −101 мВ. Потенциал реверсии находится между −74 и −82 мВ. (C) Электрическая модель мембраны мотонейрона с хлорными каналами, активируемыми тормозным медиатором Δg_{Cl} и параллельно соединенными g_{rest} и c_m.

Fig. 9.14. Direct Inhibitory Chemical Synaptic Transmission. (A) Scheme for intracellular recording from a cat spinal motoneuron and stimulation of inhibitory synaptic inputs. The membrane potential of the motoneuron is set to different levels by passing current through a second intracellular microelectrode. (B) Intracellular records of synaptic potentials evoked at membrane potentials between −64 and −101 mV. The reversal potential is between −74 and −82 mV. (C) Electrical model of the motoneuron membrane with chloride channels activated by the inhibitory transmitter, Δg_{Cl}, in parallel with the resting membrane channels, g_{rest}, and the membrane capacitance, c_m. (A and B after Coombs, Eccles, and Fatt, 1955.)

до −82 мВ тормозный потенциал становится очень маленьким и изменяет свое направление (реверсирует). При мембранном потенциале −100 мВ амплитуда реверсированного тормозного потенциала увеличивается. Потенциал реверсии в данном эксперименте составляет около −80 мВ.

Тормозные каналы проводят анионы, причем проницаемость довольно хорошо коррелирует с радиусом гидратированного проникающего иона[71, 72]. В физиологических условиях единственным анионом маленького размера, присутствующим в значительных количествах, является ион хлора. Введение ионов хлора в мотонейроны спинного мозга из микропипетки сдвигает хлорный равновесный потенциал, и соответственно потенциал реверсии ТПСП, в положительном направлении. Изменение внеклеточной концентрации хлорных ионов также вызывает изменение равновесного хлорного потенциала и потенциала реверсии ТПСП, однако результаты таких экспериментов не всегда однозначны. Это связано с тем, что изменение внеклеточной концентрации ионов хлора часто приводит к пропорциональному изменению внутриклеточной концентрации ионов хлора (глава 5), и поэтому изменение хлорного равновесного потенциала носит лишь кратковременный характер.

Это затруднение может быть преодолено, если полностью удалить ионы хлора из внеклеточной среды. На рис. 9.15 показан пример регистрации от ретикулоспинальной клетки продолговатого мозга, в которой тормозная синаптическая передача опосредована глицином[73]. Мембранный потенциал регистрировался внутриклеточным микроэлектродом. Второй электрод использовался для пропускания в клетку коротких толчков гиперполяризующего тока; вызываемое этими толчками изменение мембранного потенциала служило для оценки входного сопротивления клетки. Наконец, третья микропипетка применялась для аппликации глицина на клетку вблизи тормозного синапса, используя кратковременные толчки давления. Аппликация глицина вызывала небольшую

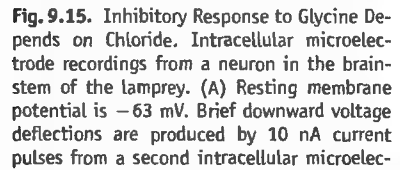


Рис. 9.15. Глициновые тормозные ответы опосредованы ионами хлора. Внутриклеточная регистрация от нейрона ствола мозга миноги. (A) Потенциал покоя составляет −63 мВ. Кратковременные отклонения потенциала вызываются толчками тока величиной 10 нА из второго внутриклеточного электрода. Амплитуда этих ответов отражает сопротивление мембраны. При добавлении глицина клетка гиперполяризуется на 7 мВ и сопротивление мембраны резко снижается. (B) После удаления ионов хлора из наружного раствора ответы на глицин исчезают. (C) При перфузии раствором с нормальным содержанием ионов хлора ответы на глицин полностью восстанавливаются.

Fig. 9.15. Inhibitory Response to Glycine Depends on Chloride. Intracellular microelectrode recordings from a neuron in the brainstem of the lamprey. (A) Resting membrane potential is −63 mV. Brief downward voltage deflections are produced by 10 nA current pulses from a second intracellular microelectrode; their amplitude indicates membrane resistance. On application of glycine (bar), the cell is hyperpolarized by about 7 mV and membrane resistance is reduced drastically. (B) After 20 min in chloride-free bathing solution, the response to glycine is abolished. (C) Five minutes after return to normal chloride solution the response has recovered. (From Gold and Martin, 1983.)

гиперполяризацию, сопровождаемую значительным уменьшением входного сопротивления (рис. 9.15A), что могло свидетельствовать об активации глицином большого количества хлорных каналов. Для проверки этой гипотезы ионы хлора были полностью удалены из наружного раствора и заменены на непроницаемый анион изотионат. Это привело также к вымыванию ионов хлора из клетки через хлорные каналы, которые открыты в состоянии покоя. Через 20 минут аппликация глицина не вызывала какого-либо заметного изменения мембранного потенциала или входного сопротивления (рис. 9.15B), что указывает на то, что помимо ионов хлора никакие другие ионы не проходят через тормозные каналы. Восстановление нормальной концентрации внеклеточных ионов хлора приводило к восстановлению ответов (рис. 9.15C).

Поскольку в основе тормозных ответов лежит увеличение хлорной проводимости, потенциал реверсии тормозного тока равен равновесному потенциалу ионов хлора, и амплитуда тока равна

$$\Delta i_{\text{inhibitory}} = \Delta i_{\text{Cl}} = \Delta g_{\text{Cl}}(V_{\text{m}} - E_{\text{Cl}}).$$

При мембранных потенциалах, более положительных, чем E_{Cl}, хлорный ток выходящий и приводит к гиперполяризации мембраны. В этом случае выходящий ток обусловлен входом отрицательно заряженных ионов хлора. При мембранных потенциалах, отрицательных по отношению к E_{Cl}, тормозный нейромедиатор вызывает выход ионов хлора и деполяризацию. Соответствующая электрическая схема изображена ни рис. 9.14C.

На ранних этапах развития центральной нервной системы млекопитающих ГАМК и глицин вызывают парадоксальные деполяризующие и возбуждающие ответы в нейронах гиппокампа[74]. Этот эффект связан не с особенностями каналов, открываемых ГАМК и глицином, а с различиями в регуляции внутриклеточной концентрации ионов хлора, приводящими к изменению потенциала равновесия ионов хлора.

Пресинаптическое торможение

До сих пор мы разграничивали возбуждающие и тормозящие синапсы на основе эффекта медиатора на постсинаптическую мембрану — то есть на основании того, для каких ионов возрастает проводимость постсинаптической мембраны: для катионов или анионов. Однако, в ряде случаев торможение не может быть объяснено в рамках лишь постсинаптического изменения проводимости[75, 76]. Этот парадокс был разрешен в результате открытия дополнительного механизма торможения —

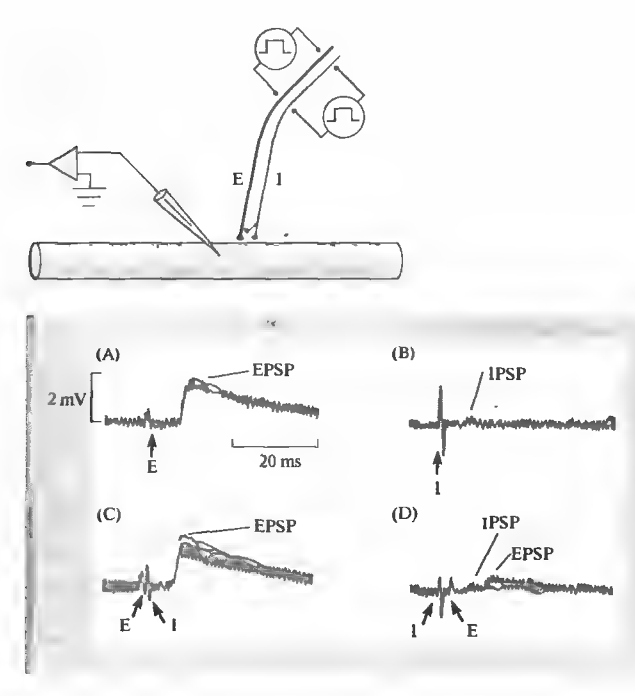


Рис. 9.16. Пресинаптическое торможение в мышечном волокне рака, который иннервируется одним возбуждающим и одним тормозным аксонами. (А) Стимуляция возбуждающего аксона [Е] вызывает ВПСП с амплитудой 2 мВ. (В) Стимуляция тормозного аксона [I] вызывает деполяризующий ТПСП с амплитудой около 0,2 мВ. (С) Если тормозный стимул следует за возбуждающим с маленькой задержкой, никакого эффекта на ВПСП не наблюдается. (D) Если тормозный стимул предшествует возбуждающему на несколько миллисекунд, то ВПСП практически полностью блокируется. Это указывает на то, что тормозный нерв оказывает пресинаптическое действие, уменьшая количество медиатора, освобождаемого из возбуждающего нерва.

Fig. 9.16. Presynaptic Inhibition in a crustacean muscle fiber innervated by one excitatory and one inhibitory axon. (A) Stimulation of the excitatory axon (E) produces a 2 mV EPSP. (B) Stimulation of the inhibitory axon (I) produces a depolarizing IPSP of about 0,2 mV. (C) If the inhibitory stimulus follows the excitatory one by a short interval, there is no effect on the EPSP. (D) If the inhibitory stimulus precedes the excitatory one by a few milliseconds, the EPSP is almost abolished. The importance of precise timing indicates that the inhibitory nerve is having a presynaptic effect, reducing the amount of excitatory neurotransmitter that is released. (After Dudel and Kuffler, 1961.)

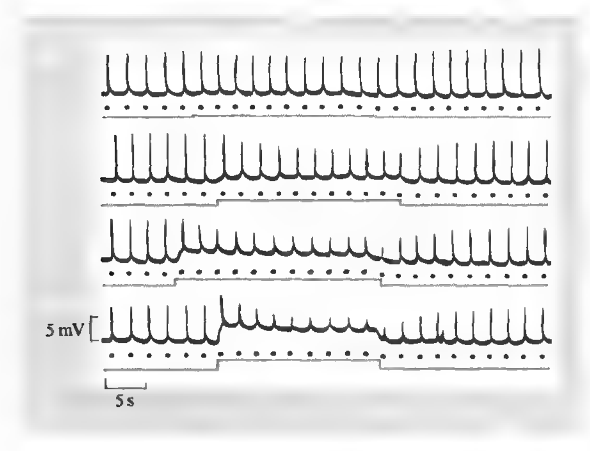


Рис. 9.17. Длительная аппликация АХ вызывает десенситизацию постсинаптических рецепторов в нервно-мышечном соединении лягушки. Внутриклеточная регистрация изменений потенциала, вызываемых короткими тестовыми ионофоретическими толчками АХ из микропипетки (указаны точками). Из другой пипетки производится длительная аппликация АХ (отмечена ступеньками внизу). Во время длительной аппликации тестовые ответы на АХ уменьшаются в результате десенситизации постсинаптических рецепторов. Чем больше АХ выделяется по время длительной аппликации, тем больше степень десенситизации.

Fig. 9.17. Prolonged Application of ACh Causes Receptor Desensitization at the frog neuromuscular junction. Intracellular recordings of potential changes produced by brief ionophoretic pulses of ACh from a micropipette (dots). Steady conditioning doses of ACh were delivered from a second pipette (upward deflections of lower traces). During the conditioning pulse the response to the test pulse decreases in amplitude as the receptors desensitize. With increasing doses the rate and extent of desensitization increase. (After Katz and Thesleff, 1957.)

пресинаптического торможения — которое было описано в спинном мозге млекопитающих в работах Экклса и его сотрудников[77], а также в нервно-мышечном соединении рака[68]. Пресинаптическое торможение вызывает уменьшение количества медиатора, освобождаемого из возбуждающих нервных окончаний[68, 78, 79].

Как показано на рис. 9.16, тормозный нерв в нервно-мышечном соединении рака не воздействует не только на мышечное волокно, но также и на возбуждающее окончание. Пресинаптический эффект длится короткое время, достигая максимума в течение нескольких миллисекунд и спадая практически до нуля в течение 6–7 мс. Максимальный тормозный эффект достигается в том случае, если нервный импульс приходит в тормозное пресинаптическое окончание за несколько миллисекунд до прихода потенциала действия в возбуждающее окончание. Влияние временной задержки между потенциалами действия в возбуждающем и тормозяшем нервах на эффективность пресинаптического торможения показано на рис. 9.16. На частях A и B показаны возбуждающий и тормозный потенциалы, вызываемые стимуляцией соответствующих нервов по отдельности. На рис. 9.16C стимулируются оба нерва, но потенциал действия в тормозном нерве следует за потенциалом действия в возбуждающем нерве с задержкой в 1,5 мс — слишком поздно, чтобы оказать какой-либо тормозящий эффект. На рис. 9.16D, потенциал действия в тормозном нерве предшествует потенциалу действия в возбуждающем нерве и вызывает значительное уменьшение возбуждающего постсинаптического потенциала.

Пресинаптический и постсинаптический эффекты опосредованы одним и тем же нейромедиатором — гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК), и связаны со значительным увеличением хлорной проводимости[80, 81]. Было предположено, что при возрастании хлорной проводимости в мембране нервного окончания деполяризующий эффект входа ионов натрия во время восходящей фазы потенциала действия частично предотвращается одновременным входом ионов хлора. В результате происходит уменьшение амплитуды пресинаптического потенциала действия и количества освобождаемого медиатора. Было показано, что пресинаптическое торможение во многих синапсах млекопитающих происходит в результате ингибирования потенциалзависимых кальциевых каналов в окончаниях аксонов[82].

Функциональные значения пресинаптического и постсинаптического торможения в центральной нервной системе довольно сильно различаются. Постсинаптическое торможение уменьшает возбудимость клетки, делая ее менее чувствительной ко всем возбуждающим входам. Пресинаптическое торможение гораздо более специфично и направлено на определенный вход, давая клетке возможность интегрировать информацию из других входов[83]. Пресинаптическое торможение предполагает, что тормозные аксоны устанавливают синаптический контакт с окончаниями возбуждающих аксонов. Наличие таких аксо-аксонных синапсов было показано с помощью электронной микроскопии в нервно-мышечном соединении рака[84] и в различных областях ЦНС млекопитающих[85]. Более того, тормозные нервные окончания сами по себе могут подвергаться влиянию на пресинаптическом уровне[86]; соответствующие ультраструктурные образования были обнаружены в тормозных синапсах рецептора растяжения рака[87]. Имеются также данные, свидетельствуюшие о существовании **пресинаптического возбуждения**, опосредованного синаптическими входами, которые увеличивают количество медиатора, освобождаемого из нервных окончаний[88].

Десенситизация

При многократной или длительной аппликации ответы, вызываемые нейромедиатором, уменьшаются; это явление получило название **десенситизации**. Десенситизация в нервно-мышечном соединении была подробно охарактеризована в работах Катца и Теслева, которые показали, что при продолжительном воздействии АХ деполяризующий ответ в мышечном волокне постепенно уменьшается (рис. 9.17)[89]. Десенситизация является молекулярным свойством самого АХ-рецептора[90]. Однако, скорость десенситизации и восстановления рецептора модулируется фосфорилированием[91)–93]. В физиологических условиях десенситизация не играет значительной роли в ответе мышечного волокна к АХ, освобождаемому из нервных окончаний[94]. Однако, в мышце, которая обработана ингибиторами холинэстеразы (например, фосфороорганическими соединениями, используемыми в качестве инсектицидов и нервно-паралитических газов), продолжительное присутствие АХ в синаптической щели достаточно для того, чтобы вызвать десенситизацию и блокировать синаптическую передачу[95].

Глутаматные и ГАМК рецепторы также подвержены десенситизации[96]. В синапсах центральной нервной системы, в которых глутамат и ГАМК участвуют в прямой химиче-

ской передаче, десенситизация постсинаптических рецепторов развивается даже в нормальных физиологических условиях и является важным фактором, определяющим амплитуду и временной ход постсинаптических потенциалов[94, 97].

Рецепторы, которые опосредуют прямую и непрямую химическую передачу

Прямая химическая синаптическая передача опосредована ионными каналами в постсинаптической мембране, которые активируются при связывании нейромедиатора, освобождаемого пресинаптической клеткой. Такие лиганд-активируемые ионные каналы называются также **ионотропными рецепторами**. Основными медиаторами в прямых химических синапсах центральной нервной системы млекопитающих являются ГАМК, глицин и глутамат. ГАМК и глицин активируют рецепторы — анионные каналы, и, следовательно, являются тормозными медиаторами (глава 13). Глутамат — наиболее часто встречающийся медиатор возбуждения в ЦНС млекопитающих. Глутамат активирует несколько различных типов ионотропных рецепторов, селективных к катионам. Другими важными медиаторами в ЦНС млекопитающих, активирующих катион-селективные ионотропные рецепторы, являются ацетилхолин, серотонин и пурины.

Все перечисленные выше нейромедиаторы прямого действия, а также такие медиаторы, как дофамин, гистамин, норадреналин и нейропептиды, могут также воздействовать на постсинаптические клетки посредством весьма отличного механизма — **непрямой химической передачи**. Непрямая химическая синаптическая передача, как правило, опосредуется **метаботропными рецепторами** — постсинаптическими рецепторами, которые вызывают образование внутриклеточных вторичных посредников. Вторичные посредники, в свою очередь, оказывают влияние на активность ионных каналов, вызывая возбуждение или торможение, а также на другие внутриклеточные мишени. Следующая глава посвящена механизмам непрямой химической синаптической передачи.

Выводы

- Передача сигналов между нервными клетками и их мишенями происходит посредством химической и электрической синаптической передачи.
- Электрическая синаптическая передача опосредуется путем прямого протекания тока между клетками.
- В химических синапсах нейромедиатор, освобождающийся из пресинаптического нервного окончания, активирует рецепторы иа постсинаптической мембране; время, необходимое для освобождения медиатора, задает минимальную синаптическую задержку (около 1 мс).
- В случае прямой химической синаптической передачи постсинаптический рецептор, который активируется нейромедиатором, является в то же время ионным каналом. Такие лиганд-активируемые ионные каналы называются ионотропными рецепторами.
- В прямых возбуждающих синапсах, как, например, в нервно-мышечном соединении позвоночных, нейромедиатор (в этом случае АХ) открывает катион-селективные ионные каналы, которые позволяют передвижение ионов натрия, калия и кальция по их электрохимическим градиентам.
- Относительная проводимость через канал различных ионов определяет потенциал реверсии; в возбуждающих синапсах потенциал реверсии положителен по отношению к порогу потенциала действия.
- В случае прямого химического синаптического торможения нейромедиатор активирует анион-селективные каналы, которые позволяют ионам хлора перемещаться по их электрохимическому градиенту. Потенциал реверсии этих токов равен равновесному хлорному потенциалу (E_{Cl}), который отрицателен по отношению к порогу потенциала действия.
- Многие рецепторы нейромедиаторов обладают способностью к десенситизации: их ответ уменьшается при часто повторяющемся или продолжительном воздействии медиатора.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Galzi, J-L., Revah, F., Bessis, A., and Changeux, J-P. 1991. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: From electric organ to brain. *Annu. Rev. Pharmacol.* 31: 37–72.
- Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- Jones, M. V., and Westbrook, G. L. 1996. The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 19: 96–101.
- Lester, H. A. 1992. The permeation pathway of neurotransmitter-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 267–292.
- Llinàs, R. 1985. Electrotonic transmission in the mammalian central nervous system. In M. V. L. Bennett and D. C. Spray (eds.), *Gap Junctions.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 337–353.
- Salpeter, M. M. (ed.). 1987. *The Vertebrate Neuromuscular Junction.* Alan R. Liss, New York.

Статьи

- Coombs, J. S., Eccles, J. C., and Fatt, P. 1955. The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory post-synaptic potential. *J. Physiol.* 130: 326–373.
- del Castillo, J., and Katz, B. 1955. On the localization of end-plate receptors. *J. Physiol.* 128: 157–181.
- Dudel, J., and Kuffler, S. W. 1961. Presynaptic inhibition at the crayfish neuromuscular junction. *J. Physiol.* 155: 543–562.
- Fatt, P., and Katz, B. 1951. An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J. Physiol.* 115: 320–370.
- Furshpan, E. J., and Potter, D. D. 1959. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* 145: 289–325.
- Kuffler, S. W., and Yoshikami, D. 1975. The distribution of acetylcholine sensitivity at the post-synaptic membrane of vertebrate skeletal twitch muscles: Iontophoretic mapping in the micron range. *J. Physiol* 244: 703–730.
- Magleby, K. L., and Stevens, C. F. 1972. The effect of voltage on the time course of end-plate currents. *J. Physiol.* 223:151–171.
- Martin, A. R., and Pilar, G. 1963. Dual mode of synaptic transmission in the avian ciliary ganglion. *J. Physiol.* 168: 443–463.
- Neher, E., and Sakmann, B. 1976. Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799–801.
- Paradiso, K., and Brehrn, P. 1998. Long-term desensitization of nicotinic acetylcholine receptors is regulated via protein kinase A-mediated phosphorylation. *J. Neurosci.* 18: 9227–9237.
- Takeuchi, A., and Takeuchi, N. 1960. On the permeability of the end-plate membrane during the action of transmitter. *J. Physiol.* 154: 52–67.
- Takeuchi, A., and Takeuchi, N. 1966. On the permeability of the presynaptic terminal of the crayfish neuromuscular junction during synaptic inhibition and the action of y-aminobutyric acid. *J. Physiol.* 183: 433–449.
- Takeuchi, A., and Takeuchi, N. 1967. Anion permeability of the inhibitory post-synaptic membrane of the crayfish neuromuscular junction. *J. Physiol.* 191: 575–590.

Цитированная литература

1. Du Bois-Reymond, E. 1848. *Untersuchungen über thierische Electricität.* Reimer, Berlin.
2. Langley, J. N., and Anderson, H. K. 1892. *J. Physiol.* 13: 460–468.
3. Elliot, T. R. 1904. *J. Physiol.* 31: (Proc.) xx–xxi.
4. Loewi, O. 1921. *Pflügers Arch.* 189: 239–242.
5. Feldberg, W. 1945. *Physiol. Rev.* 25: 596–642.
6. Dale, H. H. 1953. *Adventures in Physiology.* Pergamon, London.
7. Dale, H. H., Feldberg, W., and Vogt, M. 1936. *J. Physiol.* 86: 353–380.
8. Furshpan, E. J., and Potter, D. D. 1959. *J. Physiol.* 145: 289–325.
9. Bennett, M. V. 1997. *J. Neurocytol.* 26: 349–366.
10. Loewenstein, W. 1981. *Physiol. Rev.* 61: 829–913.
11. Llinàs, R. 1985. In *Gap Junctions.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 337–353.
12. Grinnell, A. D. 1970. *J. Physiol.* 210: 17–43.
13. Baker, R., and Llinás, R. 1971. *J. Physiol.* 212: 45–63.
14. MacVicar, B. A., and Dudek, F. E. 1981. *Science* 213: 782–785.
15. McMahon, D. G. 1994. *J. Neurosci.* 14: 1722–1734.
16. Baylòr, D. A., and Nicholls, J. G. 1969. *J. Physiol.* 203: 591–609.
17. Acklin, S. E. 1988. *J. Exp. Biol.* 137: 1–11.
18. Martin, A. R., and Pilar, G. 1963. *J. Physiol.* 168: 443–463.

19. Rovainen, C. M. 1967. *J. Neurophysiol.* 30: 1024–1042.
20. Shapovalov, A. I., and Shiriaev, B. I. 1980. *J. Physiol.* 306: 1–15.
21. Nicholls, J. G., and Purves, D. 1972. *J. Physiol.* 225: 637–656.
22. Brodin, L., et al. 1994. *J. Neurophysiol.* 72: 592–604.
23. Dityatev, A. E., and Clamann, H. P. 1996. *J. Neurophysiol.* 76: 3451–3459.
24. Draguhn, A., et al. 1998. *Nature* 394: 189–192.
25. Brivanlou, I. H., Warland, D. K., and Meister, M. 1998. *Neuron* 20: 527–539.
26. Loewenstein, W. R. 1999. *The Touchstone of Life.* Oxford University Press, New York.
27. DeVries, S. H., and Schwartz, E. A. 1989. *J. Physiol.* 414: 351–375.
28. Hampson, E. C. G. M., Vaney, D. I., and Weiler, R. 1992. *J. Neurosci.* 12: 4911–4922.
29. Silinsky, E. M., and Redman, R. S. 1996. *J. Physiol.* 492: 815–822.
30. Heuser, J. E. 1989. *Q. J. Exp. Physiol.* 74: 1051–1069.
31. Eccles, J. C., and O'Connor, W. J. 1939. *J. Physiol.* 97: 44–102.
32. Eccles, J. C., Katz, B., and Kuffler, S. W. 1942. *J. Neurophysiol.* 5: 211–230.
33. Ling, G., and Gerard, R. W. 1949. *J. Cell. Comp. Physiol.* 34: 383–396.
34. Fatt, P., and Katz, B. 1951. *J. Physiol.* 115: 320–370.
35. Langley, J. N. 1907. *J. Physiol.* 36: 347–384.
36. Nastuk, W. L. 1953. *Fed. Proc.* 12: 102.
37. del Castillo, J., and Katz, B. 1955. *J. Physiol.* 128: 157–181.
38. Miledi, R. 1960. *J. Physiol.* 151: 24–30.
39. Dennis, M. J., Harris, A. J. and Kuffler, S. W. 1971. *Proc. R. Soc. Lond. B* 177: 509–539.
40. McMahan, U. J., Spitzer, N. C., and Peper, K. 1972. *Proc. R. Soc. Lond. B* 181: 421–430.
41. Betz, W. J., and Sakmann, B. 1973. *J. Physiol.* 230: 673–688.
42. Kuffler, S. W., and Yoshikami, D. 1975. *J. Physiol.* 244: 703–730.
43. Ravdin, P., and Axelrod, D. 1977. *Anal. Biochem.* 80: 585–592.
44. Burden, S. J., Sargent, P. B., and McMahan, U. J. 1979. *J. Cell Biol.* 82: 412–425.
45. Fertuck, H. C., and Salpeter, M. M. 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1376–1378.
46. Salpeter, M. M. 1987. In *The Vertebrate Neuromuscular Junction.* Alan R. Liss, New York, pp. 1–54.
47. Heckmann, M., and Dudel, J. 1997. *Biophys. J.* 72: 2160–2169.
48. Jenkinson, D. H., and Nicholls, J. G. 1961. *J. Physiol.* 159: 111–127.
49. Takeuchi, A., and Takeuchi, N. 1959. *J. Neurophysiol.* 22: 395–411.
50. Magleby, K. L., and Stevens, C. F. 1972. *J. Physiol.* 223: 151–171.
51. Takeuchi, A., and Takeuchi, N. 1960. *J. Physiol.* 154: 52–67.
52. Takeuchi, N. 1963. *J. Physiol.* 167: 128–140.
53. Adams, D. J., Dwyer, T. M., and Hille, B. 1980. *J. Gen. Physiol.* 75: 493–510.
54. Lassignal, N. L., and Martin, A. R. 1977. *J. Gen. Physiol.* 70: 23–36.
55. Neher, E., and Sakmann, B. 1976. *Nature* 260: 799–802.
56. Dionne, V. E., and Leibowitz, M. D. 1982. *Biophys. J.* 39: 253–261.
57. Neher, E., and Steinbach, J. H. 1978. *J. Physiol.* 277: 153–176.
58. Galzi, J-L., et al. 1991. *Annu. Rev. Pharmacol.* 31: 37–72.
59. Lester, H. A. 1992. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 267–292.
60. Niu, L., and Hess, G. P. 1993. *Biochemistry* 32: 3831–3835.
61. Niu, L., Abood, L. G., and Hess, G. P. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12008–12012.
62. Dilger, J. P., et al. 1997. *J. Gen. Physiol.* 109: 401–414.
63. Bouzat, C., and Barrantes, F. J. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 25835–25841.
64. Dilger, J. P., Liu, Y., and Vidal, A. M. 1995. *Eur. J. Anaesthesiol.* 12: 31–39.
65. Mishina, M., et al. 1986. *Nature* 321: 406–411.
66. Grassi, F., et al. 1998. *J. Physiol.* 508: 393–400.
67. Herlitze, S., et al. 1996. *J. Physiol.* 492: 775–787.
68. Dudel, J., and Kuffler, S. W. 1961. *J. Physiol.* 155: 543–562.
69. Takeuchi, A., and Takeuchi, N. 1967. *J. Physiol.* 191: 575–590.
70. Kuffler, S. W., and Eyzaguirre, C. 1955. *J. Gen. Physiol.* 39: 155–184.
71. Coombs, J. S., Eccles, J. C. and Fatt, P. 1955. *J. Physiol.* 130: 326–373.
72. Hille, B. 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer, Sunderland, MA.
73. Gold, M. R., and Martin, A. R. 1983. *J. Physiol.* 342: 99–117.
74. Mladinic, M., et al. 1999. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 1207–1213.
75. Fatt, P., and Katz, B. 1953. *J. Physiol.* 121: 374–389.
76. Frank, K., and Fuortes, M. G. F. 1957. *Fed. Proc.* 16: 39–40.
77. Eccles, J. C., Eccles, R. M., and Magni, F. 1961. *J. Physiol.* 159: 147–166.
78. Kuno, M. 1964. *J. Physiol.* 175: 100–112.
79. Rudomin, P. and Schmidt, R. F. 1999. *Exp. Brain Res.* 129: 1–37.

80. Takeuchi, A., and Takeuchi, N. 1966. *J. Physiol.* 183: 433–449.
81. Fuchs, P. A., and Getting, P. A. 1980. *J. Neurophysiol.* 43: 1547–1557.
82. Wu, L.-G. and Saggau, P. 1997. *Trends Neurosci.* 20: 204–212.
83. Lomeli, J., et al. 1998. *Nature* 395: 600–604.
84. Atwood, H. L., and Morin, W. A. 1970. *J. Ultrastruct. Res.* 32: 351–369.
85. Schmidt, R. F. 1971. *Ergeb. Physiol.* 63: 20–101.
86. Nicholls, J. G., and Wallace, B. G. 1978. *J. Physiol.* 281: 157–170.
87. Nakajima, Y., Tisdale, A. D., and Henkart, M. P. 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2462–2466.
88. Radcliffe, K.A., et al. 1999. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868: 591–610.
89. Katz, B., and Thesleff, S. 1957. *J. Physiol.* 138: 63–80.
90. Auerbach, A., and Akk, G. 1998. *J. Gen. Physiol.* 112: 181–197.
91. Huganir, R. L., and Greengard, P. 1990. *Neuron* 5: 555–567.
92. Hardwick, J. C., and Parsons, R. L. 1996. *J. Neurophysiol.* 76: 3609–3616.
93. Paradiso, K., and Brehm, P. 1998. *J. Neurosci.* 18: 9227–9237.
94. Jones, M. V., and Westbrook, G. L. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 96–101.
95. Magleby, K. L., and Pallotta, B. S. 1981. *J. Physiol.* 316: 225–250.
96. Dudel, J., Adelsberger, H., and Heckmann, M. 1997. *Invertebr. Neurosci.* 3: 89–92.
97. Trussell, L. O. 1999. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 477–496.

Глава 10

Механизмы непрямой синаптической передачи

Нейромедиаторы связываются с метаботропными рецепторами, которые посредством цитоплазматических или связанных с мембраной вторичных посредников влияют на активность ионных каналов и транспортеров. Во многих синапсах в центральной и вегетативной нервной системе синаптическая передача осуществляется исключительно за счет таких непрямых механизмов. В ряде других синапсов непрямые механизмы модулируют прямую синаптическую передачу.

Непрямая синаптическая передача часто опосредуется рецепторами, связанными с G-белками. G-белки, названные так потому, что они связываются с гуаниновыми нуклеотидами, состоят из трех субъединиц: α, β и γ. Активация рецептора вызывает диссоциацию α- и $\beta\gamma$-субъединиц. В свободном состоянии субъединицы связываются с внутриклеточными мишенями и модулируют их активность. Некоторые субъединицы G-белка связываются с ионными каналами, вызывая сравнительно кратковременные эффекты. Например, G-белок активируется при связывании АХ с мускариновыми рецепторами на клетках синатриального узла сердца. Освобождающаяся при этом $\beta\gamma$-субъединица связывается с калиевым каналом и вызывает его открывание, что приводит к урежению сердцебиений.

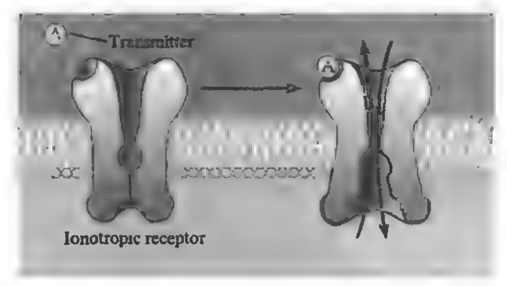
Вторым механизмом действия G-белков является активация ферментов, которые вызывают образование внутриклеточных посредников. Примером такого механизма является активация G-белков в кардиомиоцитах при связывании норадреналина с β-адренорецепторами. Активированные α- и $\beta\gamma$-субъединицы стимулируют фермент аденилатциклазу. Образующийся в результате циклический АМФ активирует другой фермент — цАМФ-зависимую протеинкиназу, которая модулирует активность ионных каналов и ферментов путем их фосфорилирования. Эти ответы могут длиться от нескольких секунд до нескольких часов и часто могут продолжаться длительное время после того, как взаимодействие медиатора с рецептором заканчивается. Такие механизмы обеспечивают значительное усиление сигнала.

Главными мишенями непрямого действия медиаторов являются калиевые и кальциевые каналы. Непрямое действие медиаторов может вызывать открывание или закрывание каналов, а также изменение их потенциалзависимости. Так, путем непрямого действия медиаторы открывают калиевые каналы в клетках синатриального узла сердца, ингибируют кальциевые каналы N-типа в симпатических нейронах и увеличивают вероятность открывания кальциевых каналов в кардиомиоцитах при деполяризации. Модуляция ионных каналов в пресинаптических нервных окончаниях приводит к изменениям в процессе освобождения медиаторов, а в постсинаптических клетках — к изменению спонтанной активности нейронов и ответов, вызываемых синаптическими входами.

Помимо прямых механизмов синаптической передачи, которые были рассмотрены в главе 9, медиаторы также действуют непрямым образом, связываясь с рецепторами, которые сами по себе не являются ионными каналами. Такие рецепторы в свою очередь модифицируют активность ионных каналов, ионных транспортеров и рецепторных белков (рис. 10.1). Непрямые механизмы называют также «медленными» или «связанными с внутриклеточными посредниками». Многие рецепторы непрямого действия вызывают свои эффекты посредством взаимодействия с ГТФ-связывающими белками (G-белками)[1] и называются также **метаботропными рецепторами**.

В некоторых синапсах, как, например, в синапсах между симпатическими нейронами и мышечными волокнами в сердце[2] или между фоторецепторами и определенными биполярными клетками в сетчатке[3], синаптическая передача происходит исключительно через непрямые механизмы. В других синапсах непрямые механизмы могут модулировать эффективность прямой синаптической





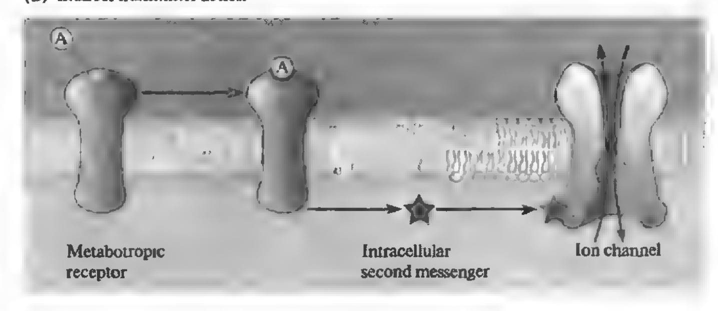


Рис. 10.1. Прямое и непрямое действие медиаторов. (A) В прямом химическом синапсе медиатор связывается с ионотропным рецептором. Ионотропные рецепторы — это лиганд-активируемые ионные каналы. (B) Медиаторы непрямого действия связываются с метаботропными рецепторами. Метаботропные рецепторы сами по себе не являются ионными каналами. Они активируют внутриклеточные пути сигнализации с вовлечением вторичных посредников, которые влияют на открывание и закрывание ионных каналов.

Fig. 10.1. Direct and Indirect Transmitter Action. (A) At direct chemical synapses the transmitter binds to an ionotropic receptor. Ionotropic receptors are ligand-activated ion channels. (B) Indirectly acting transmitters bind to metabotropic receptors. Metabotropic receptors are not themselves ion channels, but rather activate intracellular second messenger signaling pathways that influence the opening and closing of ion channels.

передачи (глава 16), что называется процессом **нейромодуляции**. В этой главе мы сначала рассмотрим структуру и функции метаботропных рецепторов и G-белков. Затем мы рассмотрим примеры синаптических взаимодействий, которые они могут опосредовать. Мы увидим, что метаботропные рецепторы, действуя через G-белки, влияют на огромное количество механизмов внутриклеточной сигнализации, значительно модифицируя нейрональную активность на несколько секунд, минут, часов и даже на еще более длительное время.

§ 1. Метаботропные рецепторы и G-белки

Структура метаботропных рецепторов

Связанные с G-белками метаботропные рецепторы составляют суперсемейство мембранных белков, характеризующихся семью трансмембранными доменами с внеклеточным аминным концом и карбоксильным внутриклеточным концом (рис. 10.2)[4)]. В настоящее время идентифицировано более тысячи различных метаботропных рецепторов. Некоторые из них активируются ацетилхолином (мускариновые холинэргические рецепторы), другие связываются с норадреналином (α- и β-адренорецепторы), ГАМК, 5-HT, дофамином, пуринами; есть метаботропные рецепторы, которые активируются светом (родопсин) (глава 19), запахами — одорантами (глава 17), а также протеазами.

Биохимические, структурные и генетические эксперименты выявили несколько различных способов связывания лиганда, каждый из которых приводит к одинаковому изменению структуры α-геликальной области, которая формирует трансмембранную часть рецептора (рис. 10.2). Участки второй и третьей цитоплазматических петель, а также примембранный участок карбоксильного окон-

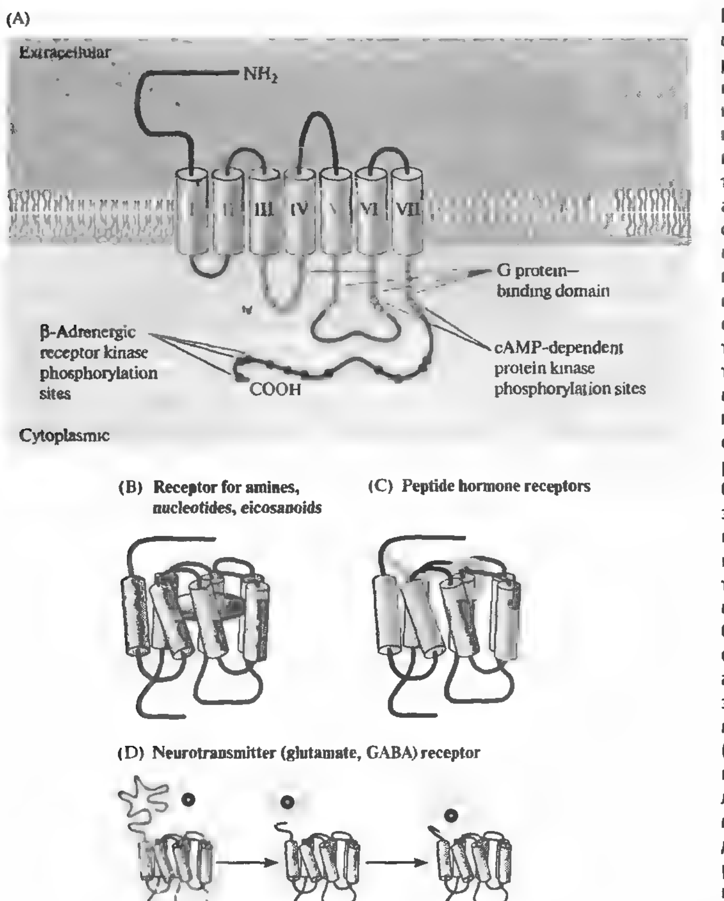


Рис. 10.2. Метаботропные рецепторы. (A) Метаботропные рецепторы имеют семь трансмембранных доменов, внеклеточный аминный конец и внутриклеточный карбоксильный конец. Вторая и третья цитоплазматические петли, а также примембранный участок внутриклеточного конца образуют место связывания с соответствующим G-белком. Фосфорилирование нескольких оснований на третьей цитоплазматической петле и карбоксильном конце (например, цАМФ-зависимой протеинкиназой) вызывает десенситизацию рецептора. Фосфорилирование карбоксильного конца G-белок-зависимыми рецептор-киназами (GRKs), например, β-адренорецептор-киназой (βARK), также вызывает десенситизацию рецептора, связывание белка аррестина и прекращает ответ. (B) Места связывания аминов, нуклеотидов и эйкозаноидов образуются участками трансмембранных доменов. (C) В рецепторах пептидных гормонов участок связывания лиганда находится на наружной части трансмембранных доменов. (D) В метаботропных рецепторах глутамата и ГАМК место связывания лиганда находится на наружном N-конце.

Fig. 10.2. Metabotropic or G Protein-Coupled Transmitter Receptors. (A) Indirectly coupled transmitter receptors have seven transmembrane domains, an extracellular amino terminus, and an intracellular carboxy terminus. The second and third cytoplasmic loops, together with the amino-terminal region of the intracellular tail, mediate binding to the appropriate G protein. Phosphorylation of sites on the third cytoplasm loop and the carboxy terminus by second messenger-related kinases, such as cAMP-dependent protein kinase, causes receptor desensitization. Phosphorylation of sites on the carboxy terminus by G protein coupled receptor kinases (GRKs), such as β-adrenergic receptor kinase (βARK), causes receptor desensitization, binding of the protein arrestin, and termination of the response. (B) Portions of the transmembrane domains form the ligand-binding sites of metabotropic receptors that bind amines, nucleotides, and eicosanoids. (C) Ligands bind to the outer portions of the transmembrane domains of peptide hormone receptors. (D) The amino-terminal tail forms the ligand-binding domain of metabotropic receptors for glutamate and GABA. (After Ji, Grossmann, and Ji, 1998.)

чания участвуют в связывании и активации соответствующих G-белков[5, 6].

Структура и функция G-белков

G-белки, названные так по их способности связываться с гуаниновыми нуклеотидами, являются тримерами, состоящими из трех субъединиц: α, β и γ (рис. 10.3)[7]. Существует большое количество разновидностей каждой из субъединиц (20 α, 6 β, 12 γ), что создает основу для огромного количества их комбинаций. G-белки разделяются на четыре основных группы по структуре и мишеням их α-субъединиц: G_s стимулирует аденилатциклазу; G_i ингибирует аденилатциклазу; G_q связывается с фосфолипазой C; мишени G_{12} пока не известны. Семейство G_i включает G_t

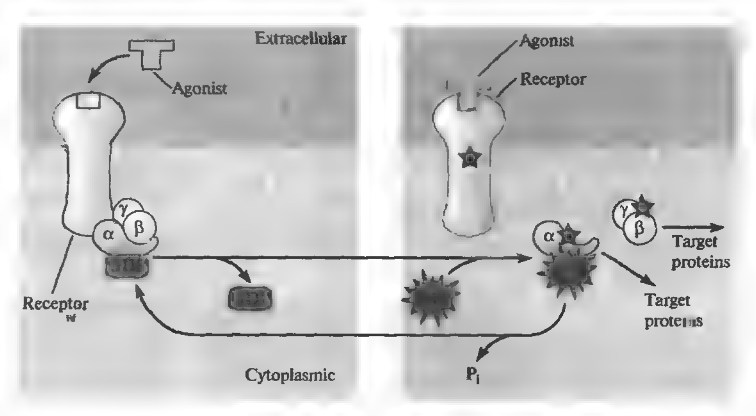


Рис. 10.3. Метаботропные рецепторы действуют через G-белки. G-белки являются тримерами, состоящими из α-, β- и γ-субъединиц. Активация метаботропного рецептора, происходящая при связывании агониста (отмечено звездочкой), вызывает замену ГТФ (GTP) на ГДФ (GDP) на α-субъединице G-белка. Это приводит к активации α-субъединицы и $\beta\gamma$-комплекса, которые отсоединяются от рецептора и друг от друга. В свободном состоянии активная α-субъединица и $\beta\gamma$-комплекс взаимодействуют с белками-мишенями. α-субъединица обладает эндогенной ГТФ-азной активностью, и гидролиз ГТФ до ГДФ с образованием неорганического фосфата (P_i) приводит к обратному связыванию всех субъединиц в неактивный $\alpha\beta\gamma$-комплекс и окончанию ответа.

Fig. 10.3. Indirectly Coupled Transmitter Receptors Act through G Proteins. G proteins are trimers of α, β, and γ subunits. Activation of a metabotropic receptor by agonist binding (indicated by a star) promotes the exchange of GTP for GDP on the α subunit of the G protein. This activates the α subunit and the $\beta\gamma$ complex, causing them to dissociate from the receptor and from one another. The free activated α-GTP subunit and $\beta\gamma$ complex each interact with target proteins. Hydrolysis of GTP to GDP and inorganic phosphate (P_i) by the endogenous GTPase activity of the α subunit leads to association of the $\alpha\beta\gamma$ complex, terminating the response.

(трансдуцин), который активирует фосфодиэстеразу цГМФ (глава 19), а также две изоформы G_o, которые связываются с ионными каналами. Вместе с тем, каждый из G-белков может взаимодействовать с несколькими эффекторами, а разные G-белки могут модулировать активность одних и тех же ионных каналов[8].

В неактивированном состоянии гуанозиндифосфат (ГДП) связан с α-субъединицей, и все три субъединицы объединены в тример (рис. 10.3). Взаимодействие с активированным рецептором позволяет гуанозинтрифосфату (ГТФ) заместить ГДП на α-субъединице, что приводит к диссоциации α- и $\beta\gamma$-субъединиц (в физиологических условиях β- и γ-субъединицы остаются связанными). Свободные α- и $\beta\gamma$-субъединицы связываются с белками-мишенями и модулируют их активность[7, 9, 10]. Свободная α-субъединица обладает ГТФ-азной активностью, вызывая гидролиз ГТФ с образованием ГДП. В результате α- и $\beta\gamma$-субъединицы вновь связываются, что приводит к прекращению их активности. Время жизни активированных субъединиц G-белка модулируется белками, которые называются GAP (белки, активирующие ГТФазную активность). Эти белки влияют на скорость, с которой гидролизуется ГТФ, связанная с α-субъединицей[11].

Тонкие детали взаимодействия субъединиц G-белков между собой и с их мишенями в настоящее время интенсивно исследуются с использованием методов молекулярной биологии[5] и рентгеновской кристаллографии[12)–14].

Десенситизация

Как и в случае ионотропных рецепторов (глава 9), ответы, опосредованные G-белками, могут десенситизироваться — т. е. уменьшаться при продолжительной активации. Десенситизация может быть обусловлена двумя механизмами[15]. В первом случае киназа, регулируемая вторичными посредниками, например, цАМФ-зависимая протеинкиназа, может фосфорилировать несколько типов рецепторов, связанных с G-белками. Во втором случае быстрая и специфичная к агонисту десенситизация вовлекает два других семейства белков. Первым этапом является фосфорилирование активированных рецепторов специфической киназой, связанной с G-белком (GRK), например, киназой β-адренорецептора (βARK). Затем протеин из семейства аррестинов связывается с фосфорилированным рецептором, блокируя его способность активировать G-белки, и таким образом ограничивает ответ.

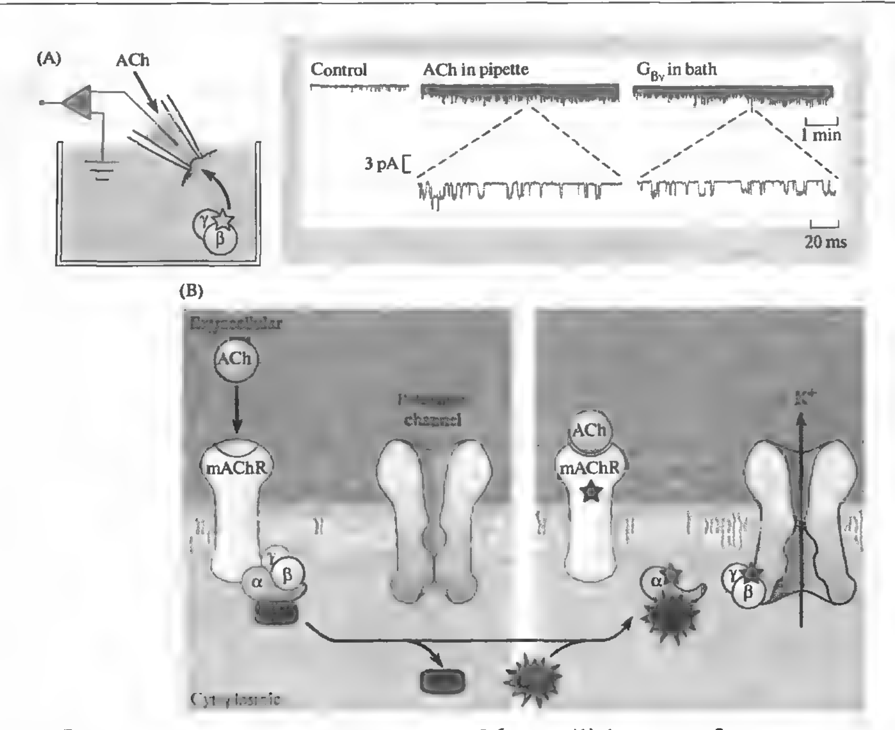


Рис. 10.4. Прямая модуляция активности ионного канала G-белком. (А) Аппликация $G_{\beta\gamma}$-комплекса на внутриклеточную сторону мембраны мышечной клетки предсердия вызывает увеличение тока через калиевые каналы, аналогичное эффекту ацетилхолина при его воздействии с наружной стороны мембраны. (В) Связывание АХ с мускариновым рецептором (mAChR) активирует G-белок; активированный $\beta\gamma$-комплекс напрямую связывается с калиевым каналом и вызывает его открывание.

Fig. 10.4. Direct Modulation of Channel Function by G Proteins. (A) Application of the $G_{\beta\gamma}$ complex to the intracellular surface of an isolated patch of membrane from a rat atrial muscle cell ($G_{\beta\gamma}$ in bath) results in an increase in potassium channel current similar to that seen when acetylcholine is added to the extracellular side of the patch (ACh in pipette). (B) Schematic representation of events in an intact cell. Binding of ACh to muscarinic receptors (mAChR) activates a G protein (indicated by a star); activated $\beta\gamma$ complex binds directly to and opens a potassium channel. (A after Wickman et al., 1994.)

§ 2. Прямая модуляция активности ионных каналов G-белками

G-белки вовлечены в регуляцию по крайней мере десятка различных калиевых, натриевых и кальциевых каналов посредством около 70 различных рецепторов[16]. G-белки опосредуют взаимодействие рецепторов с ионными каналами либо напрямую, непосредственно связываясь с ионными каналами, либо опосредованно — с вовлечением вторичных посредников. Многообразие сигнальных каскадов делает возможным то, что один и тот же медиатор может вначале вызвать возбуждение, а затем — торможение постсинаптической клетки, равно как и другие паттерны ответов в различных типах нейронов.

Активация калиевых каналов G-белками

Замедление сердцебиений под действием ацетилхолина, впервые исследованное Леви более 70 лет назад (глава 9), опосредовано метаботропным рецептором — **мускариновым ацетилхолиновым рецептором**. Мускариновые рецепторы получили свое название потому, что они селективно активируются мускарином; ионотропные АХ рецепторы селективно активируются никотином и потому называются никотиновыми (главы 3 и 9). Активация мускариновых рецепторов в сердце приводит

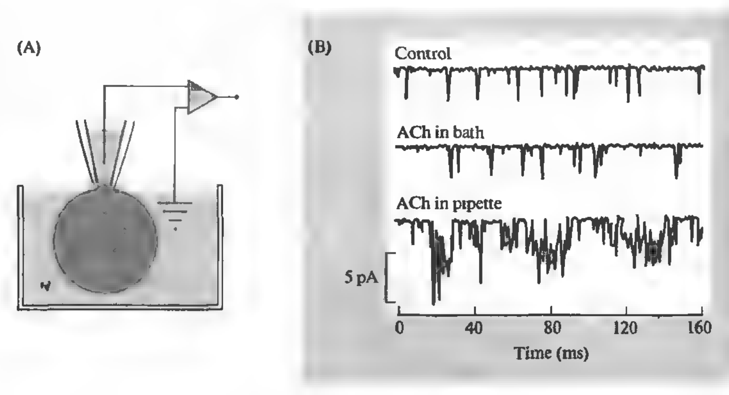


Рис. 10.5. Локальный примембранный эффект G-белков с прямым механизмом действия. (А) Эффекты АХ исследовались с помощью пэтч-кламп регистрации в конфигурации cell-attached. АХ может быть добавлен либо в регистрирующую пипетку, либо в наружный раствор. (В) Записи токов через одиночные каналы до и после добавления АХ. Активность каналов возрастала лишь при добавлении АХ в пэтч-пипетку.

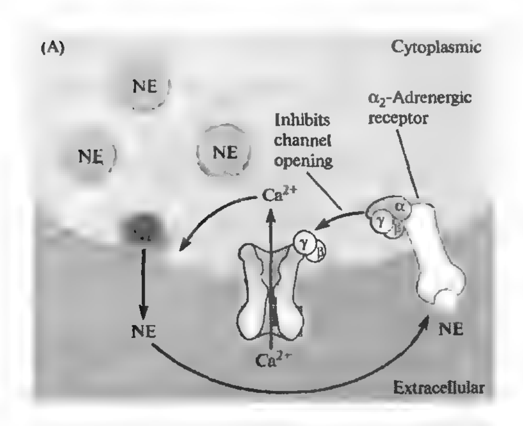
Fig. 10.5. Direct, or Membrane-Delimited, Effects of G Proteins operate over short distances. (A) Effects of ACh were assayed by cell-attached patch clamp recording. Acetylcholine could be perfused into either the patch pipette or the bath. (B) Recordings of single-channel currents before and during addition of ACh. Compared with the control, channel activity increased only when ACh was added to the patch pipette. (After Soejima and Noma, 1984.)

к открыванию калиевых каналов[17], вызывая гиперполяризацию.

В ряде экспериментов было показано, что открывание калиевых каналов, происходящее при активации мускариновых рецепторов, опосредовано G-белками[18, 19]. Так, было обнаружено, что для активации калиевых каналов необходима внутриклеточная ГТФ[20], что активация калиевых каналов мускариновыми агонистами значительно продляется при внутриклеточном введении негидролизируемого аналога ГТФ — Gpp(NH)p[21] и что мускариновая активация калиевых каналов блокируется коклюшным токсином, который инактивирует G_i-белки[20]. Важная информация о механизмах активации калиевых каналов в кардиомиоцитах была получена Клэпхамом и сотрудниками в экспериментах на изолированных участках мембраны. Используя конфигурацию inside-out, они показали, что при аппликации очищенной $\beta\gamma$-субъединицы с внутренней стороны мембраны происходит открывание калиевого канала (рис. 10.4)[22]. Этот эксперимент продемонстрировал, что $\beta\gamma$-субъединица ответственна за открывание калиевого канала. Последующие эксперименты с клонированным мускарин-активируемым калиевым каналом (GIRK1) показали, что $\beta\gamma$-субъединица взаимодействует с калиевым каналом напрямую (см. рис. 10.4В)[23, 24]. Интересно то, что при регистрации в конфигурации cell-attached калиевые каналы активируются при добавлении мускариновых агонистов в пипетку, добавление же мускариновых агонистов в наружный раствор не приводит к активации каналов в регистрируемом участке мембраны (рис. 10.5)[25]. Таким образом, активированная $\beta\gamma$-субъединица не в состоянии преодолеть зону контакта между пипеткой и мембраной, что свидетельствует о весьма ограниченном радиусе действия активированной $\beta\gamma$-субъединицы.

Ингибирование кальциевых каналов, опосредованное G-белками

Другим примером прямого взаимодействия между G-белками и ионными каналами является саморегуляция освобождения норадреналина из нейронов симпатического ганглия лягушки[26]. Освобождаемый этими нейронами норадреналин не только активирует рецепторы на постсинаптических клетках-мишенях, но также действует на сами пресинаптические нервные окончания через α_2-адренорецепторы (рис. 10.6А). Активация **ауторецепторов** (autoreceptors) ослабляет выделение медиатора (рис. 10.6В), снижая вероятность открывания N-типа кальциевых каналов (рис. 10.7). (Кальциевые каналы разделяются на несколько классов [L, T, N, P, Q и R] по кинетике и фармакологическим свойствам (глава 3). Освобождение медиатора из симпатических нейронов контролируется кальцием, входящим через N-тип кальциевых каналов[27].) Эксперименты с негидролизируемыми производными ГТФ выявили, что ответ на норадреналин опосредован



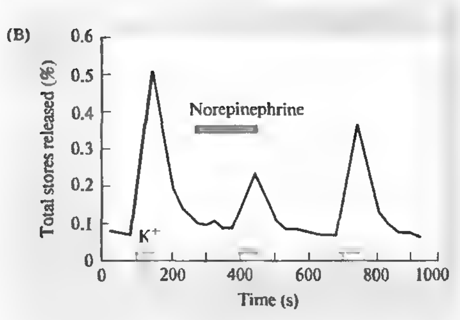


Рис. 10.6. Пресинаптические ауторецепторы уменьшают освобождение медиатора. (А) Норадреналин (norepinephrine, NE), освобождаемый из симпатических нейронов, связывается с α_2-адренорецепторами (*ауторецепторами*) на мембране нервного окончания и вызывает активацию G-белка. Активный $\beta\gamma$-комплекс связывается с кальциевыми каналами, что приводит к уменьшению входа кальция и освобождения медиатора. (В) Норадреналин уменьшает освобождение медиатора из симпатических ганглиев. В ганглии был введен радиоактивный норадреналин. Освобождение медиатора вызывалось аппликацией раствора с высокой концентрацией ионов калия (50 ммоль). Добавление в наружный раствор немеченого норадреналина (30 мкмоль) приводило к уменьшению освобождения радиоактивного норадреналина, вызываемого калиевой деполяризацией.

Fig. 10.6. Presynaptic Autoreceptors Reduce Transmitter Release. (A) Norepinephrine (NE) released from sympathetic neurons combines with α_2-adrenergic receptors in the terminal membrane (called autoreceptors), activating a G protein. The activated $\beta\gamma$ complex binds to calcium channels, decreasing calcium influx and so limiting further transmitter release. (B) Norepinephrine reduces the release of transmitter from sympathetic ganglia. Ganglia were loaded with radioactive norepinephrine and then enclosed in a perfusion chamber. Transmitter release was evoked by depolarization with a solution containing 50 m*M* potassium (light bars). Addition of 30 μM unlabeled norepinephrine to the perfusion solution (dark bar) reduced the amount of radiolabeled transmitter released in response to potassium-induced depolarization. (B after Lipscombe, Kongsamut, and Tsien, 1989.)

G-белками. Ингибирование активности кальциевых каналов в cell-attached конфигурации наблюдается лишь тогда, когда норадреналин добавляется в регистрирующую пипетку, а не снаружи, что предполагает прямое взаимодействие между G-белками и кальциевыми каналами. При повышенной экспрессии или просто инъекции α- и $\beta\gamma$-субъединиц в клетки было обнаружено, что кальциевые каналы N-типа блокируются $\beta\gamma$-субъединицей[28, 29]. Такой тормозный эффект является быстрым и локальным механизмом для регуляции выброса медиатора[27].

§ 3. Активация G-белками внутриклеточных вторичных посредников

Многие G-белки взаимодействуют с ионными каналами не напрямую, а через модуляцию активности ферментов, вовлеченных в цитоплазматические системы вторичных посредников: аденилатциклазы, фосфолипазы С, фосфолипазы A_2, фосфодиэстеразы и фосфатидилинозитол 3-киназы. Продукты этих ферментов, в свою очередь, оказывают воздействие на мишени, которые влияют на активность ионных каналов и других внутриклеточных процессов. В отличие от быстрых и локальных ответов, вызываемых прямым взаимодействием субъединиц G-белков с ионными каналами, ответы, опосредованные цитоплазматическими системами вторичных посредников, более медленные и имеют больший радиус действия.

β-Адренорецепторы активируют кальциевые каналы через G-белки и аденилатциклазу

Одним из наиболее хорошо изученных примеров непрямой синаптической передачи, опосредованной внутриклеточными вторичными посредниками, является активация β-адренорецепторов в сердечной мышце под действием

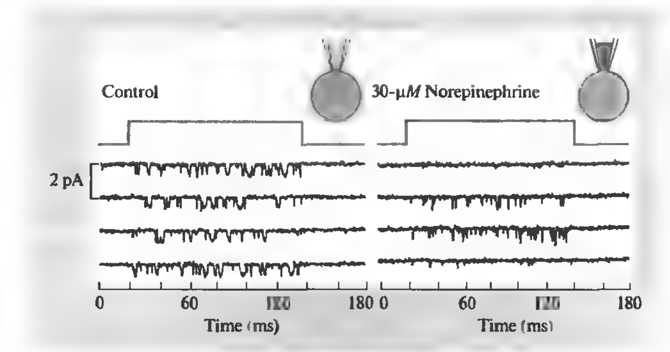


Рис. 10.7. Норадреналин ингибирует активность кальциевых каналов. Токи через одиночные ионные каналы регистрировались в конфигурации cell-attached. Каналы активировались деполяризацией мембраны. При добавлении норадреналина в пэтч-электрод амплитуда токов не изменялась, однако каналы начинали открываться реже и на более короткое время.

Fig. 10.7. Norepinephrine Inhibits Calcium Channel Activity. Single-channel currents were recorded in cell-attached patches; channels were activated with a depolarizing pulse (top trace). When norepinephrine was included in the patch electrode, the unitary currents did not change in size, but channel openings were less frequent and of shorter duration. (After Lipscombe, Kongsamut, and Tsien, 1989.)

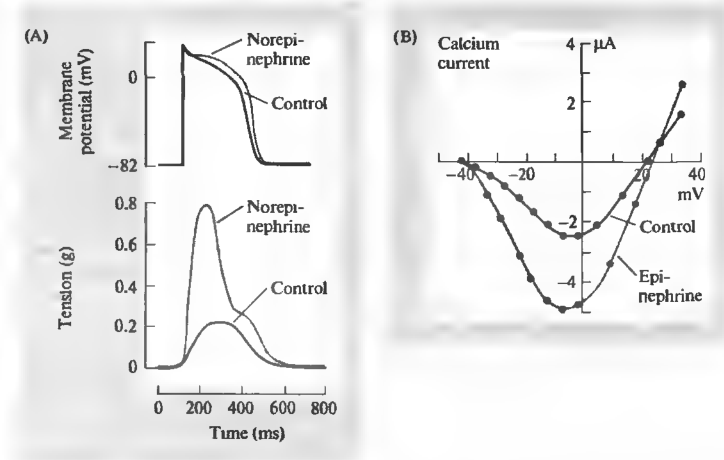


Рис. 10.8. Активация β-адренорецепторов приводит к увеличению кальциевого тока в сердечной мышце. (А) Увеличение кальциевого тока, вызываемое активацией β-адренорецепторов, приводит к увеличению амплитуды и длительности потенциала действия и силы сокращения мышечных клеток сердца. (В) Вольтамперная характеристика кальциевого тока в миокардиоцитах, измеренная в условиях фиксации потенциала в контроле и после добавления адреналина — агониста β-адренорецепторов.

Fig. 10.8. Activation of β-Adrenergic Receptors in Cardiac Muscle Increases Calcium Current. (A) The increase in calcium current produced by activation of β-adrenergic receptors, in this case by addition of 10^{-6} *M* norepinephrine, increases action potential amplitude and duration and the tension produced by cardiac muscle cells. (B) Current–voltage relationship of calcium current in a myocardial cell measured under voltage clamp conditions in the absence and presence of 0,5 μM epinephrine, a β-adrenergic receptor agonist. (A after Reuter et al., 1983; B after Reuter, 1974.)

норадреналина[2, 30]. Норадреналин вызывает учащение сердцебиения и усиление сокращений сердечной мышцы (рис. 10.8А). Увеличение сократительной силы отчасти обусловлено увеличением амплитуды и длительности фазы плато сердечного потенциала действия, что связано с увеличением лежащего в его основе кальциевого тока (рис. 10.8В). Регистрация одиночных каналов в кардиомиоцитах в конфигурации cell-attached подтвердила, что стимуляция β-адренорецепторов агонистами (норадреналином или изопротеренолом) вызывает увеличение активности кальциевых каналов (рис. 10.9). Более того, оказалось, что для получения ответа не обязательно добавлять агонист во внутрипипеточный раствор. Добавление изопротеренола в наружный раствор также вызывает увеличение активности кальциевых каналов в самом исследуемом кусочке (пэтче) мембраны, что является диагностическим тестом для ответов, опосредованных диффундирующими внутриклеточными вторичными посредниками[31, 32].

Активация β-адренорецепторов связана с увеличением кальциевой проводимости посредством внутриклеточного вторичного по-

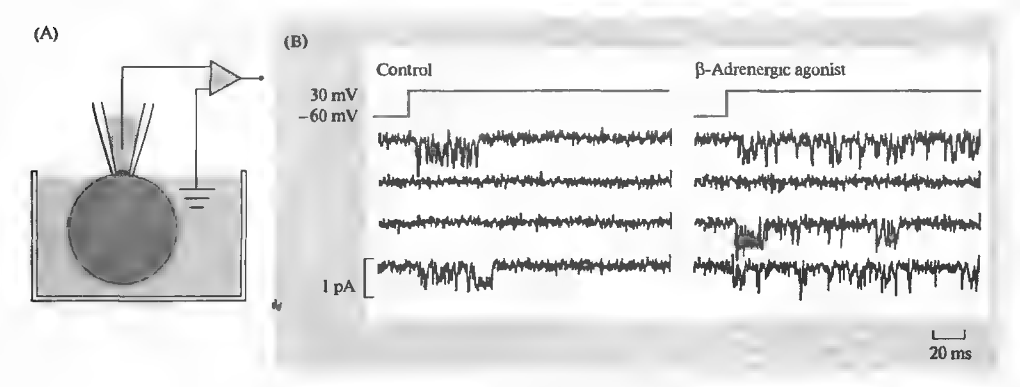


Рис. 10.9. Активация β-адренорецепторов вызывает увеличение активности кальциевых каналов. (А) Регистрация производилась в конфигурации cell-attached от небольшого участка мембраны, содержащего два кальциевых канала. (В) Добавление в наружный раствор изопротеренола (β-адренергический агонист) вызывает увеличение вероятности открывания кальциевого канала при деполяризации мембраны.

Fig. 10.9. β-Adrenergic Agonists Cause an Increase in Calcium Channel Activity during a depolarizing pulse. (A) Recordings are from a voltage-clamped cell-attached patch. (B) Consecutive records of the activity of a patch containing two calcium channels. Addition of 14 μM isoproterenol, a β-adrenergic agonist, to the bath causes an increase in the probability that the calcium channel will open when the cell is depolarized. (After Tsien, 1987.)

средника циклического АМФ (цАМФ). Как проиллюстрировано на рис. 10.10, связывание норадреналина с β-адренорецепторами на клетках сердца активирует G-белок (G_s), освобождая его α- и $\beta\gamma$-субъединицы. В данном случае как α, так и $\beta\gamma$-субъединицы связываются и активируют фермент аденилатциклазу; стимулирующий эффект α-субъединицы намного сильнее, чем $\beta\gamma$-субъединицы (эффекты различных G_α- и $G_{\beta\gamma}$-субъединиц на различные изоформы аденилатциклазы значительно различаются[33, 34]). Аденилатциклаза превращает АТФ в цАМФ — быстро диффундирующий внутриклеточный вторичный посредник, который активирует другой фермент — цАМФ-зависимую протеинкиназу. Каталитическая субъединица этой протеинкиназы опосредует перенос фосфата с АТФ на гидроксильные группы серина и треонина в различных ферментах и каналах, таким образом модулируя их активность.

В пользу этой схемы β-адренергической стимуляции кальциевой проводимости в кардиомиоцитах свидетельствует целая серия наблюдений[2]. Например, активность кальциевых каналов увеличивается под действием форсколина, ингибиторов фосфодиэстеразы, мембранопроницаемых производных цАМФ, а также при прямой внутриклеточной инъекции цАМФ. Внутриклеточная инъекция каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы также приводит к увеличению кальциевых токов, в то время как инъекция избыточного количества регуляторной субъединицы или ингибиторов протеинкиназы блокирует адренергическую стимуляцию кальциевых токов. ATPγS (аналог АТФ) усиливает адренергическую активацию кальциевых каналов путем образования стабильных фосфорилированных белков, в то время как внутриклеточная инъекция фосфатаз предотвращает адренергическую стимуляцию кальциевых токов или даже приводит к ее подавлению путем удаления фосфатных групп с фосфорилированных белков.

Регуляция активности кальциевых каналов через другие сигнальные пути

Помимо норадреналина, другие нейромедиаторы и гормоны также обладают способностью модулировать активность кальциевых каналов в сердечной мышце[2]. Многие из этих веществ действуют через метаботропные рецепторы и G-белки, стимулируя или ингибируя аденилатциклазу; в действие других вовлечены иные внутриклеточные системы вторичных посредников. Например, АХ, действуя через мускариновые рецепторы, активирует G_i, который ингибирует аденилатциклазу. Это приводит к уменьшению концентрации цАМФ и подавлению активности кальциевых каналов.

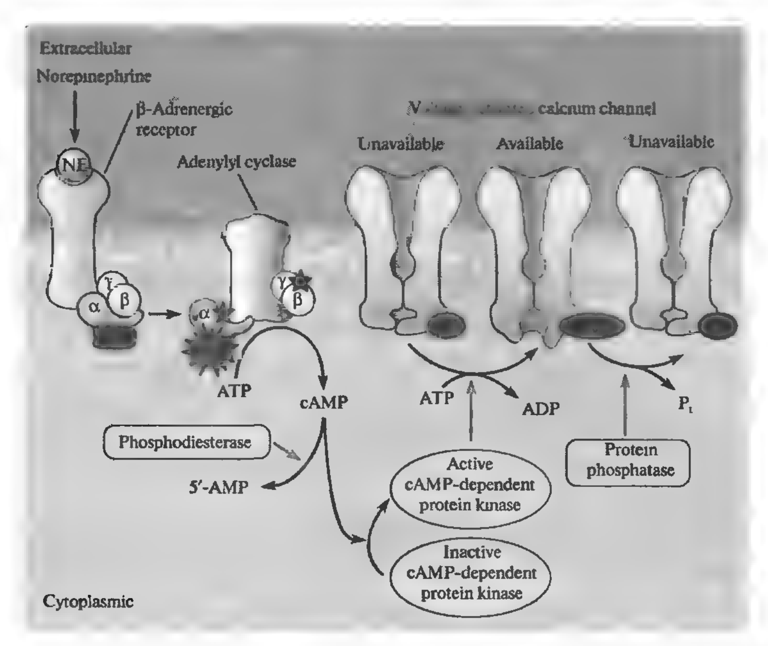


Рис. 10.10. Влияние β-адренорецепторов на кальциевые каналы опосредовано внутриклеточным вторичным посредником цАМФ (cyclic AMP, cAMP). Связывание норадреналина с β-адренорецептором приводит посредством G-белка к активации фермента аденилатциклаза. Аденилатциклаза катализирует реакцию образования цАМФ из АТФ. цАМФ активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу — фермент, который фосфорилирует белки по сериновым и треониновым гидроксильным группам. Ответ на норадреналин прекращается в результате гидролиза цАМФ до 5'-АМФ и дефосфорилирования белков фосфатазами. В кардиомиоцитах норадреналин вызывает фосфорилирование потенциалзависимых кальциевых каналов, переводя их в форму, в которой они могут быть активированы при деполяризации мембраны.

Fig. 10.10. β-Adrenergic Receptors Act through the Intracellular Second Messenger Cyclic AMP to increase calcium channel activity. Binding of norepinephrine to β-adrenergic receptors activates, through a G protein, the enzyme adenylyl cyclase. Adenylyl cyclase catalyzes the conversion of ATP to cyclic AMP. As the concentration of cyclic AMP increases, it activates cAMP-dependent protein kinase, an enzyme that phosphorylates proteins on serine and threonine residues (—OH). The response to norepinephrine is terminated by the hydrolysis of cyclic AMP to 5'-AMP and the removal of protein phosphate residues by protein phosphatases. In cardiac muscle cells, norepinephrine causes phosphorylation of voltage-activated calcium channels, converting them to a form that can be opened by depolarization (available).

Модуляция активности кальциевых каналов посредством фосфорилирования

Приведенные выше эксперименты явно указывают на то, что эффекты β-адренергической стимуляции на кальциевые токи опосредованы увеличением цАМФ и активацией протеинкиназы. При этом, однако, оставалось неясным, какие белки подвергаются фосфорилированию. Последующие эксперименты выявили, что мишенью процесса фосфорилирования являются сами кальциевые каналы. Для этого сначала потребовалось выделить и очистить кальциевые каналы L-типа (каналы этого типа активируются при стимуляции β-адренорецепторов в сердечной мышце) из скелетных мышц, используя специфические и обладающие высоким сродством ингибиторы — дигидропиридины. Выделенные таким образом каналы были встроены в липидные везикулы[35] и искусственные мембраны[36] и подвергнуты воздействию цАМФ-зависимой протеинкиназы (рис. 10.11). В результате происходило фосфорилирование белков и вероятность открывания кальциевых каналов значительно возрастала. Это привело к выводу, что в основе β-адренергической модуляции кальциевых каналов L-типа лежит цАМФ-за-

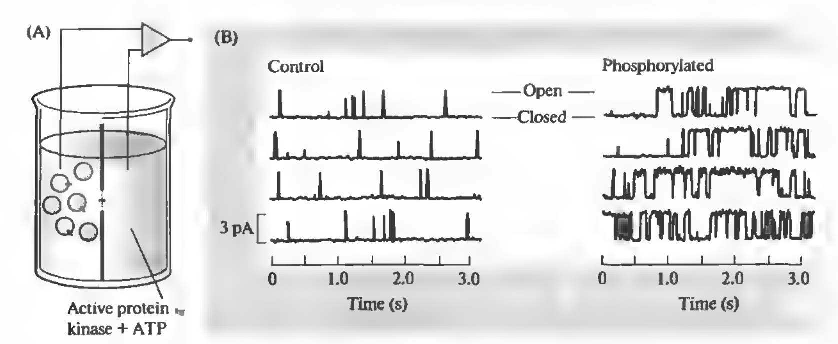


Рис. 10.11. Фосфорилирование кальциевых каналов увеличивает вероятность их открывания. (А) Встроенные в маленькие липидные везикулы (липосомы) кальциевые каналы добавляются в раствор с одной стороны искусственной бислойной мембраны. При слиянии липосом с мембраной становится возможным регистрировать активность одиночных ионных каналов. (B) Фосфорилирование увеличивает вероятность открывания каналов. Записи активности одиночных каналов до и после добавления АТФ и каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы с одной стороны бислойной мембраны.

Fig. 10.11. Phosphorylation of Calcium Channels Increases Their Probability of Opening. (A) Purified calcium channels, incorporated into small lipid vesicles (liposomes), are added to the solution on one side of a phospholipid bilayer. When liposomes fuse into the bilayer membrane, single-channel events can be recorded. (B) Phosphorylation increases the probability of channel opening. Single-channel records before and after adding ATP and the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase to the solution bathing one side of the bilayer. Biochemical studies demonstrate that the calcium channel itself becomes phosphorylated. (After Flockerzi et al., 1986.)

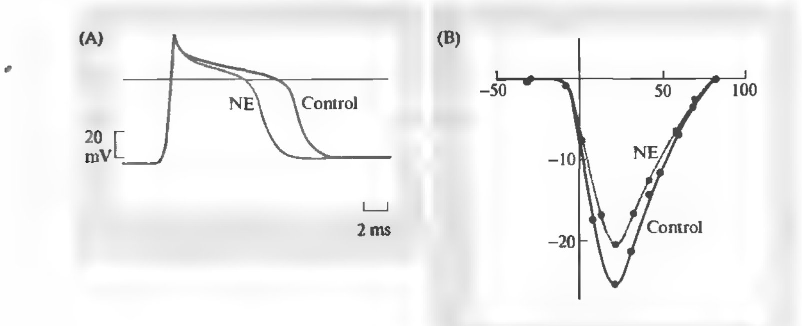


Рис. 10.12. Норадреналин уменьшает длительность потенциала действия в нейронах дорзального ганглия цыпленка. (А) Норадреналин (NE) уменьшает длительность потенциала действия при регистрации внутриклеточным электродом. (B) Вольтамперная характеристика кальциевого тока, регистрируемого в присутствии тетродотоксина и тетраэтиламмония, в контроле и после добавления норадреналина. Норадреналин уменьшает потенциал-активируемый кальциевый ток, что является причиной уменьшения длительности потенциала действия.

Fig. 10.12. Norepinephrine Decreases the Duration of Action Potentials in chick dorsal root ganglion cells in culture. (A) Norepinephrine (NE; 10^{-5} *M*) causes a decrease in the duration of the action potential recorded with an intracellular microelectrode. (B) Current–voltage relationship for calcium current recorded from cells bathed in solutions containing tetrodotoxin and tetraethylammonium, and 10 m*M* calcium, with or without 10^{-4} *M* norepinephrine. Norepinephrine reduces the voltage-activated calcium current, which accounts for the decreased duration of the action potential. (After Dunlap and Fischbach, 1981.)

висимое фосфорилирование самих кальциевых каналов. Модуляция активности кальциевых каналов L-типа другими гормонами также опосредована их фосфорилированием либо через аденилатциклазу и цАМФ-зависимую протеинкиназу, либо через другие сигнальные пути вторичных посредников и протеинкиназ[2].

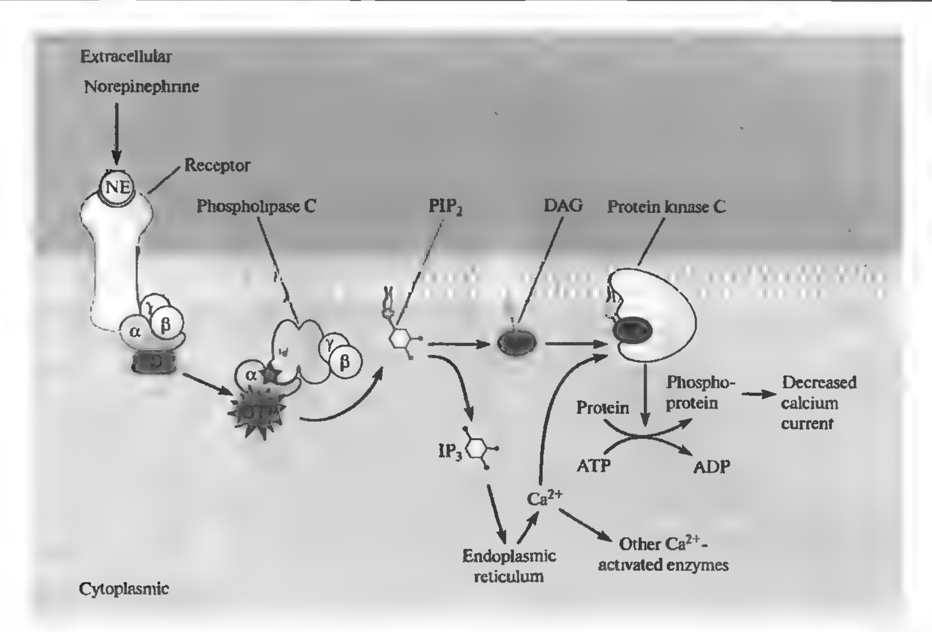


Рис. 10.13. Влияние норадреналина на кальциевые каналы в нейронах дорзального ганглия цыпленка опосредовано внутриклеточными вторичными посредниками диацилглицеролом и IP_3. Связывание норадреналина с рецептором приводит посредством G-белков к активации фермента фосфолипаза С. Этот фермент гидролизует фосфолипид фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат (PIP_2) с образованием двух внутриклеточных вторичных посредников: диацилглицерола (DAG) и инозитол 1,4,5-трифосфата (IP_3). IP_3 вызывает освобождение кальция из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму. Действуя вместе, DAG и кальций активируют протеинкиназу С. Протеинкиназа С фосфорилирует ряд белков, что, в частности, приводит к уменьшению кальциевых токов.

Fig. 10.13. Norepinephrine Acts through the Intracellular Second Messengers Diacylglycerol and IP_3 to reduce calcium current in chick dorsal root ganglion cells. The binding of norepinephrine to its receptor activates, through a G protein, the enzyme phospholipase C. This enzyme hydrolyzes the phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2), releasing two intracellular second messengers: diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3). IP_3 releases calcium from the endoplasmic reticulum into the cytoplasm. DAG and calcium together activate protein kinase C. Protein kinase C catalyzes increased protein phosphorylation. In chick neurons, this causes a decrease in calcium current.

Двухступенчатый ферментативный каскад, вовлекающий аденилатциклазу и цАМФ-зависимую протеинкиназу, обеспечивает мощное усиление сигнала по сравнению с прямым открыванием или закрыванием каналов под действием активированных G-белков. Каждая активированная молекула аденилатциклазы катализирует синтез большого количества молекул цАМФ и, таким образом, активирует большое количество молекул протеинкиназ, а каждая молекула протеинкиназы может фосфорилировать большое количество белков. Таким образом, активация лишь небольшого количества рецепторов приводит к модуляции большого количества белков-мишеней на значительном расстоянии. Более того, цАМФ-зависимая протеинкиназа может фосфорилировать различные белки и таким образом модулировать широкий спектр клеточных процессов.

Активация фосфолипазы С

Модуляция кальциевого тока во время пресинаптического потенциала действия является одним из механизмов, с помощью которых может осуществляться регуляция эффективности синаптической передачи[37]. Например, при внутриклеточной регистрации от нейронов, выделенных из дорзального ганглия спинного мозга и выращенных в культуральных условиях, было обнаружено, что ГАМК, норадреналин, серотонин и пептиды энкефалин и соматостатин вызывают укорочение

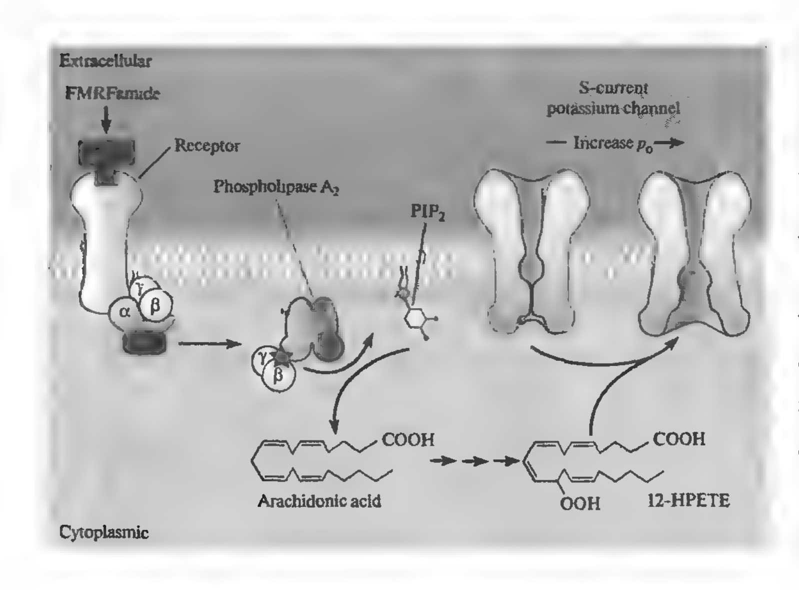


Рис. 10.14. Нейропептид FMRFamide через активацию внутриклеточного вторичного посредника — арахидоновую кислоту — увеличивает активность калиевых каналов в сенсорных нейронах ЦНС аплизии. Связывание FMRFamide с рецептором приводит посредством G-белков к активации фермента фосфолипаза A_2. Этот фермент расщепляет фосфолипиды мембраны, например, PIP_2, с образованием арахидоновой кислоты. Арахидоновая кислота метаболизируется по липоксигеназному пути с образованием HPETE, который связывается с калиевыми каналами S-типа и увеличивает вероятность их открывания.

Fig. 10.14. The Neuropeptide FMRFamide Acts through the Intracellular Second Messenger Arachidonic Acid to increase potassium channel activity in sensory neurons in the CNS of *Aplysia*. Binding of FMRFamide to its receptor activates, through a G protein, the enzyme phospholipase A_2. This enzyme degrades membrane phospholipids, such as PIP_2, forming arachidonic acid. Arachidonic acid is metabolized along the lipoxygenase pathway to form 12-HPETE, which binds to S-current potassium channels and increases their probability of opening (p_o).

потенциалов действия за счет уменьшения кальциевого тока (рис. 10.12)[38]. Количество выделяемого медиатора уменьшалось пропорционально уменьшению кальциевого тока[39].

Механизмы, лежащие в основе действия норадреналина и ГАМК, изображены на рис. 10.13. Связывание норадреналина и ГАМК с метаботропными рецепторами приводит к активации G_i-белка. Участие G-белка было показано в эксперименте, в котором внутриклеточное введение GDPβS (аналога ГДФ, который предотвращает активацию G-белков) блокировало уменьшение длительности потенциалов действия. Таким же эффектом обладал коклюшный токсин (pertussis toxin), который необратимо инактивирует α-субъединицу семейства G_i.

G_i активирует фосфолипазу C (рис. 10.13). Фосфолипаза C гидролизует мембранный липид фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат (PIP_2) с образованием двух молекул: инозитол 1,4,5-трифосфата (IP_3) и диацилглицерола (DAG). IP_3 вызывает освобождение кальция из эндоплазматического ретикулума[40, 41]. Повышение цитоплазматической концентрации кальция и DAG активирует протеинкиназу C. Протеинкиназа C, в свою очередь, фосфорилирует серин и треонин на белках-мишенях.

Имеются два экспериментальных доказательства того, что эффекты норадреналина и ГАМК на длительность потенциала действия опосредованы протеинкиназой C[37]. Во-первых, прямая активация протеинкиназы C аналогами диацилглицерола вызывает уменьшение кальциевого тока в этих нейронах. Во-вторых, ингибиторы протеинкиназы C блокируют уменьшение кальциевых токов, вызываемое как аналогами диацилглицерола, так и самими медиаторами ГАМК и норадреналином.

Активация фосфолипазы A_2

Другой мишенью G-белков является фосфолипаза A_2. Воздействуя на DAG и определенные мембранные липиды, например, PIP_2, этот фермент вызывает освобождение арахидоновой кислоты. Арахидоновая кислота метаболизируется по двум путям: липоксигеназному, с образованием лейкотриенов

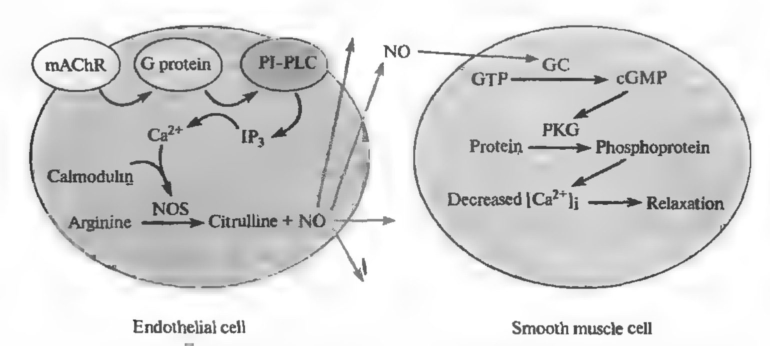


Рис. 10.15. Паракринное действие NO. Ацетилхолин связывается с мускариновыми рецепторами (mAChR) на эндотелиальных клетках кровеносных сосудов и активирует фосфатидилинозитид-специфическую фосфолипазу C (PI-PLC). PI-PLC вызывает образование IP_3, который вызывает освобождение кальция из внутриклеточных депо. Кальций, связавшись с кальмодулином, активирует NO-синтазу (NOS), которая вызывает образование NO. NO диффундирует в близлежащие гладкомышечные клетки и стимулирует гуанилатциклазу (GC), которая катализирует образование цГМФ. цГМФ активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу (PKG), и последующее фосфорилирование белков приводит к уменьшению внутриклеточной концентрации кальция и мышечному расслаблению. NO имеет короткое время жизни и поэтому его действию подвергаются лишь близлежащие клетки — поэтому его действие называется паракринным.

Fig. 10.15. Paracrine Signaling by Release of Nitric Oxide. ACh binds to muscarinic receptors (mAChR) on vascular endothelial cells, activating phosphotidylinositide-specific phospholipase C (PI-PLC). PI-PLC forms inositol trisphosphate (IP_3), which releases calcium from intracellular stores. Calcium, together with calmodulin, activates nitric oxide synthase (NOS), producing nitric oxide (NO). NO diffuses into neighboring smooth muscle cells and stimulates guanylyl cyclase (GC), increasing cGMP. Cyclic GMP activates cGMP-dependent protein kinase (PKG). The resulting increases in protein phosphorylation lead to a decrease in intracellular calcium concentration, causing relaxation. NO is rapidly degraded, so that it affects only nearby cells—hence the term "paracrine".

и HPETES, и циклооксигеназному, с образованием простагландинов и тромбоксанов[42].

Арахидоновая кислота модулирует нейрональную активность, действуя напрямую на ионные каналы[43, 44], через активацию протеинкиназы C[45] и через свои метаболиты[46]. Например, в сенсорных нейронах аплизии арахидоновая кислота образуется в ответ на пептид FMRFamide и метаболизируется по липоксигеназному пути до 12-HPETE. 12-HPETE связывается с калиевыми каналами S-типа и увеличивает вероятность их открывания (рис. 10.14)[47, 48]. Этот эффект приводит к гиперполяризации постсинаптических мышечных клеток и торможению синаптической передачи между сенсорным нейроном и мышечным волокном[49, 50].

Сигнализация через NO и CO

Окись азота (nitric oxide, NO) является водо- и жирорастворимым газом, образующимся из аргинина под действием фермента NO-синтазы. NO — это медиатор, который диффундирует из цитоплазмы клетки, в которой он образуется, в соседние клетки, где он активирует фермент гуанилатциклазу[51, 52]. NO был впервые описан как регулятор кровяного давления, опосредующий расширение сосудов при воздействии ацетилхолина[53]. Взаимодействие АХ с мускариновыми рецепторами на эндотельиальных клетках сосудов приводит к активации фосфолипазы C, образованию IP_3 и освобождению ионов кальция из внутриклеточных депо (рис. 10.15). Кальций связывается с кальмодулином и активирует NO-синтазу, приводя к образованию NO. NO диффундирует в соседние гладкомышечные клетки и стимулирует растворимую гуанилатциклазу, что приводит к увеличению концентрации внутриклеточного цГМФ. цГМФ, в свою очередь, активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу. Фосфорилирование белков модулирует активность калиевых и кальциевых каналов, а также кальциевых насосов, приводя к уменьшению внутриклеточной концентрации кальция, что в конечном счете вызывает мышечное расслабление. NO инактивируется в течение нескольких секунд, взаимодействуя с супероксидами и образуя комплексы с белками крови, например, с гемоглобином.

Выяснение сигнального пути, вовлекающего NO, привело к пониманию механизма действия нитроглицерина, который уже дав-

но используется при лечении ишемической болезни сердца. Нитроглицерин является донором NO и особенно эффективен для расширения коронарных артерий. Его действие приводит к увеличению кровоснабжения сердца и устранению боли, возникающей при ишемической болезни сердца.

В мозге NO-синтаза связана с ионотропным NMDA рецептором глутамата (глава 3)[54, 55]. Кальциевые ионы, входящие через активированный NMDA рецептор, связываются с кальмодулином, и кальций-кальмодулиновый комплекс активирует NO-синтазу[56]. Основным эффектом NO в мозге, так же как и в гладких мышцах, является стимуляция гуанилатциклазы[52]. NO вовлечен в разнообразные синаптические взаимодействия как у беспозвоночных, так и позвоночных животных[57]—[60].

Свойства монооксида углерода (CO) во многом схожи со свойствами NO[56, 61]. CO продуцируется оксигеназой гема, находяшейся в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов и активирующейся при фосфорилировании протеинкиназой С. Легко растворимый в липидах и воде, CO диффундирует в близлежащие гладкомышечные клетки и стимулирует образование цГМФ, вызывая вазодилятацию. Помимо этого, NO-синтаза и оксигеназа гема были обнаружены в нейронах, располагаюшихся в стенках кишечника, и было показано, что NO и CO принимают участие в расслаблении гладкомышечных клеток кишечника. Специфическая форма оксигеназы гема (HO2) сконцентрирована в мозге и имеет такое же распределение, как и растворимая гуанилатциклаза, что предполагает участие CO в сигнализации в ЦНС.

Важной особенностью сигналов, опосредованных NO и CO, является то, что эти вещества не могут накапливаться в синаптических везикулах и освобождаться аксонными окончаниями в специфических местах, расположенных возле постсинаптической мембраны с соответствуюшими рецепторами. Вместо этого, NO и CO равномерно диффундируют от места их синтеза в близлежащие клетки, и их распространение лимитируется только их коротким временем жизни. Этот тип сигнализации, промежуточный между прямой синаптической передачей и освобождением гормонов эндокринными органами в кровеносное русло, называется **паракриниым**. Очевидно, что специфичность эффектов такого рода паракринных сигналов зависит от распределения и свойств ферментов, активируемых или ингибируемых NO или CO.

Модуляция калиевых и кальциевых каналов метаботропными рецепторами

Важным обобщением из всего вышеизложенного является то, что калиевые и кальциевые каналы служат первичной мишенью для модуляции нейромедиаторами, действующими через метаботропные рецепторы. Изменения в активности этих каналов могут влиять на мембранный потенциал покоя, спонтанную активность, на ответы, вызываемые другими возбуждающими и тормозными входами, и на количество кальция, входящего во время потенциала действия. Эти эффекты оказывают очень сильное влияние на сигнализацию в нервной системе. Весьма сложно предсказать, каким образом непрямые механизмы будут модулировать активность каналов в данной клетке. Например, норадреналин и ГАМК уменьшают кальциевые токи в сенсорных нейронах цыпленка через активацию протеинкиназы С[37], в то время как ГАМК — но не норадреналин, — действуя через цАМФ-зависимый механизм, продляет кальциевые потенциалы действия в чувствительных нейронах миноги, ингибируя кальций-активируемые калиевые каналы[62]. Сложность этих взаимодействий наблюдается и на уровне одной клетки: активность нейронов верхнего ресничного ганглия крысы модулируется по крайней мере девятью медиаторами, действующими через пять связанных с G-белками путей, каждый из которых влияет на активность двух кальциевых каналов и одного калиевого канала[63].

§ 4. Кальций в роли внутриклеточного вторичного посредника

Концентрация кальция в клетках определяется его входом через лиганд- или потенциал-активируемые каналы (глава 3) и активностью кальциевых насосов и ионных обменников (глава 4). Помимо этого, кальций может освобождаться из внутриклеточных депо при входе в клетку кальция, натрия или под действием IP_3[64, 65]. Истощение внутриклеточных депо вызывает открывание расположенных на клеточной мембране кальциевых каналов особого типа, называемых i_{crac}[66, 67].

С развитием оптических методов измерения внутриклеточной концентрации кальция было сделано два значительных наблюдения. Во-первых, были обнаружены кальциевые микродомены — особые участки клетки, в которых происходит ограниченное повышение концентрации кальция[68)—71)]. Соответственно, эффекты, опосредованные кальцием, зависят от его внутриклеточного распределения, распределения белков, активируемых кальцием, и их мишеней — ферментов и ионных каналов. Во-вторых, было обнаружено, что физиологические сигналы часто вызывают высокодинамичные изменения в концентрации кальция в виде осцилляций, спайков, спарков (искорок) и волн[41, 65, 72, 73)]. Было также обнаружено, что различные пространственно-временные паттерны изменения внутриклеточной концентрации кальция запускают различные каскады внутриклеточных биохимических реакций[74)].

Быстрое ингибирование синаптической передачи, опосредованное кальцием

Синаптическое торможение между эфферентными слуховыми волокнами и волосковыми клетками цыпленка является примером того, как кальций, входя в волосковые клетки через ионотропные рецепторы, действует в качестве вторичного посредника, активируя другие ионные каналы[75)]. В этом синапсе ацетилхолин, освобождаемый из эфферентных нервных окончаний, активирует на постсинаптической мембране волосковых клеток ионотропные нейрональные ацетилхолиновые рецепторы, которые пропускают в клетку кальций и другие катионы. Можно ожидать, что результатом будет обычное возбуждение, как и в нервно-мышечном соединении. Однако в волосковых клетках входящий кальций вызывает открывание кальций-активируемых калиевых каналов, тем самым вызывая торможение постсинаптической клетки (рис. 10.16А).

На рис. 10.16В показана схема эксперимента, в котором волосковые клетки регистрировались с помощью методики пэтч-кламп в конфигурации whole-cell (от целой клетки). Короткий пульс АХ вызывал в клетке большой выходящий (тормозной) калиевый ток, которому предшествовал маленький входящий ток. При добавлении в регистрирующий электрод (и соответственно в цитоплазму клетки) кальциевого хелатора BAPTA выходящий ток исчезал, выявляя замаскированный им значительный входящий катионный ток. Объяснение этому явлению простое: при входе в клетку кальций сразу же связывается с хелатором BAPTA, что предотвращает его действие на кальций-активируемые кальциевые каналы. Было показано, что похожий механизм торможения существует и в ЦНС[76)].

Многообразие путей кальциевой сигнализации

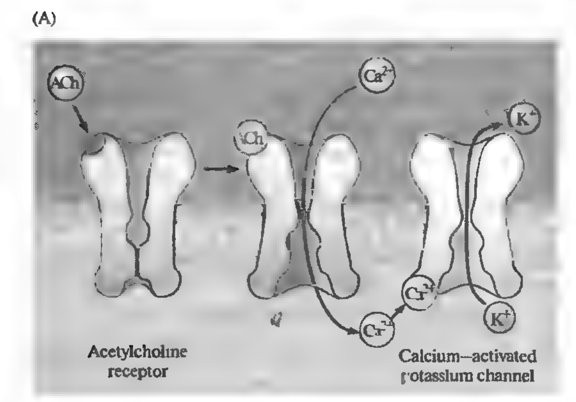
Внутриклеточный кальций регулирует калиевые, катион-селективные и хлорные каналы, расположенные на клеточной мембране, а также активность связанных с мембраной фосфолипаз С и A_2 (рис. 10.17)[77)]. Эти ферменты, вовлеченные в образование внутриклеточных вторичных посредников IP_3, диацилглицерола и арахидоновой кислоты, также регулируются G-белками (см. выше). В цитоплазме кальций активирует три основных мишени: протеинкиназу С, кальмодулин и кальций-зависимую протеазу (кальпаин).

Кальпаины являются группой протеаз, которые вовлечены в регуляцию цитоскелета и мембранных белков[78, 79)]. Кальмодулин является белком с четырьмя местами связывания кальция[80, 81)]. Когда все эти места связаны с кальцием, кальмодулин становится способным активировать кальций/кальмодулин-зависимую протеинкиназу, аденилатциклазу, фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов, протеин фосфатазу (кальцинейрин), а также NO-синтазу.

§ 5. Длительное действие медиаторов непрямого действия

Синаптические взаимодействия, опосредованные непрямыми механизмами, развиваются, как правило, более медленно и длятся намного дольше, чем взаимодействия, опосредованные прямыми механизмами. В нервно-мышечном соединении на скелетной мышце требуется всего одна-две миллисекунды для того, чтобы АХ освободился, прошел через синаптическую щель, связался и открыл ионотропные ацетилхолиновые рецепторы. В случае ответов, опосредованных, например, аденилатциклазой или фосфолипазой

(A)



(B)

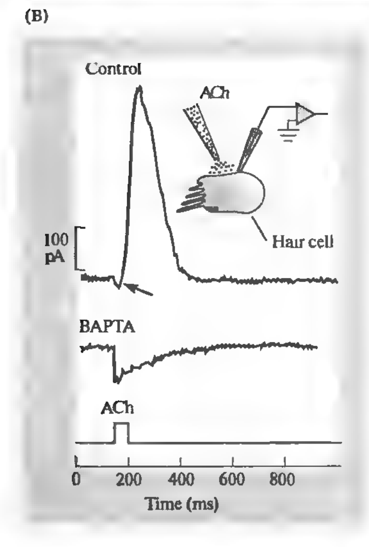


Рис. 10.16. Торможение, опосредованное АХ-активируемыми катионными каналами, в волосковых клетках цыпленка. (А) АХ связывается с ионотропными рецепторами, через которые катионы, в том числе кальций, входят внутрь клетки. Входящий кальций активирует кальций-зависимые калиевые каналы, вызывая выходящий калиевый ток и гиперполяризацию. (B) В условиях whole-cell регистрации аппликация АХ на основание волосковой клетки вызывает кратковременный ток небольшой амплитуды (отмечен стрелкой), за которым следует выходящий ток большой амплитуды. В интактной клетке такой ток будет приводить к торможению. При добавлении хелатора кальция BAPTA в регистрирующий электрод (откуда он проникает в цитоплазму) выходящий ток полностью блокируется, поскольку входящий через АХ-рецепторы кальций связывается с хелатором, что предотвращает активацию кальций-зависимых калиевых каналов.

Fig. 10.16. Inhibition by ACh-Activated Cation Channels in hair cells from the chick cochlea. (A) In chick hair cells ACh binds to ionotropic receptors that allow cations, including calcium, to flow into the cell. Intracellular calcium causes calcium-activated potassium channels to open, leading to outward potassium current and hyperpolarization. (B) In a whole-cell recording (inset), application of ACh near the base of a hair cell produces a small, transient inward current (arrow) followed by a large outward current. In the intact cell, the outward current would be inhibitory. If the calcium chelator BAPTA is added to the recording electrode, and hence to the cell cytoplasm, ACh application produces only inward current. No outward current is seen because incoming calcium ions are chelated and so prevented from activating potassium channels. (Records kindly provided by P. A. Fuchs.)

С, синтез только одной молекулы цАМФ или гидролиз одного мембранного липида занимает несколько миллисекунд. Даже процесс активации мембранного канала при связывании субъединицы G-белка к самому ионному каналу имеет временной ход в секундном диапазоне, что отражает время жизни активной α-субъединицы[82]. Ответы, опосредованные ферментативными реакциями с образованием внутриклеточных вторичных посредников типа цАМФ или IP_3, имеют еще более длительный временной ход и длятся от нескольких секунд до нескольких минут, что отражает медленные изменения в концентрации вторичных посредников.

В то же время опыт нам подсказывает, что некоторые изменения в передаче сигналов в нервной системе могут сохраняться на всю жизнь. Каким образом могут происходить столь долговременные изменения в эффективности синаптической передачи? Одним из объяснений этому может быть особое свойство протеинкиназ, о которых говорилось в этой главе. Эти ферменты сами по себе являются мишенью для фосфорилирования. Например, изначально активированная кальцием, CaM-киназа II фосфорилирует сама себя[83]. Если фосфорилируются несколько субъединиц, то свойства этого энзима кардинально меняются: он становится постоянно активным, и кальций-кальмодулиновый комплекс больше не требуется для поддержания его активности. Такого рода механизм может обеспечить долговременные изменения в активности киназы, что в свою очередь может привести к столь же длительному изменению в активности белков, являющихся мишенью этого фермента.

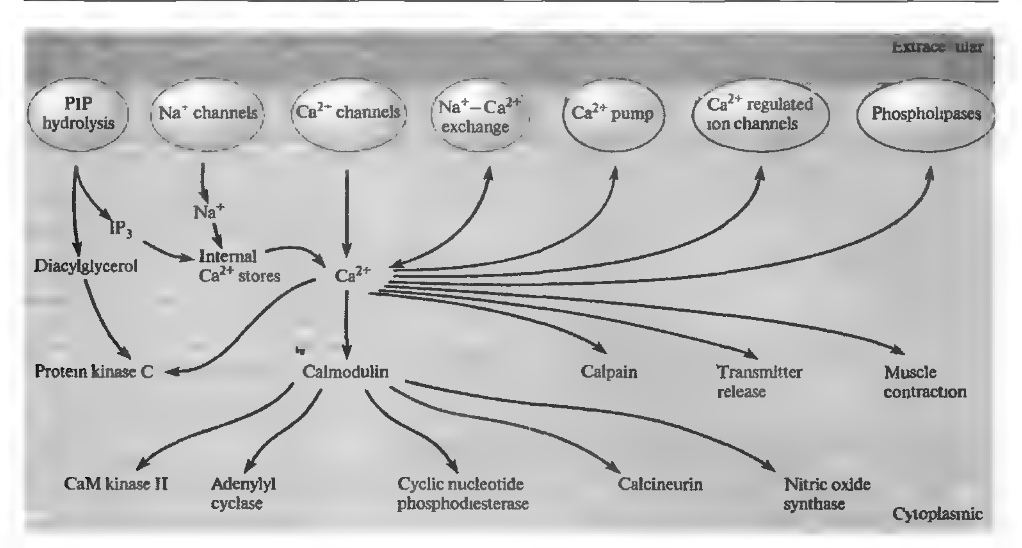


Рис. 10.17. Кальций в роли внутриклеточного вторичного посредника. Концентрация кальция в цитоплазме регулируется его входом через ионные каналы, активностью кальциевых насосов и обменников, секвестрацией во внутриклеточных депо (в том числе в эндоплазматическом ретикулуме), а также освобождением из внутриклеточных депо, которое может вызываться IP_3 и входом натрия и кальция. В свою очередь, кальций регулирует активность мембранных и цитоплазматических белков, включая ионные каналы, обменники, насосы, фосфолипазы, протеинкиназу С, кальмодулин и кальпаин.

Fig. 10.17. Calcium as an Intracellular Second Messenger. The concentration of calcium in the cytoplasm is regulated by influx through membrane channels, by the activity of calcium pumps and exchangers in the plasma membrane, by sequestration in internal stores such as the endoplasmic reticulum, and by release from internal storage sites by sodium influx, calcium influx, and IP_3. Calcium, in turn, regulates membrane and cytosolic proteins, including ion channels, exchangers, pumps, phospholipases, protein kinase C, calmodulin, and calpain. (After Kennedy, 1989.)

Для того, чтобы изменения сохранялись в течение нескольких дней и больше, обычно требуется изменения на уровне синтеза белков. Было показано, что многие из систем вторичных посредников, описанные в этой главе, вызывают изменения в синтезе белков (рис. 10.18)[84)–86)]. Эти изменения обычно происходят в результате активации одного или более сигнальных каскадов фосфорилирования белков, что приводит к фосфорилированию факторов транскрипции и изменению в экспрессии генов. Самые быстрые эффекты наблюдаются в случае экспрессии немедленных ранних генов *c-fos*, *c-jun* и *zif*/268I, которые кодируют индуцируемые факторы транскрипции из семейств Fos, Jun и Krox[87)]. По окончании трансляции эти белки входят в ядро, где регулируют последующую экспрессию генов, приводя к метаболическим и структурным изменениям, навсегда изменяющим клеточные свойства.

Выводы

- Нейромедиаторы активируют метаботропные рецепторы в клетках-мишенях. Метаботропные рецепторы сами по себе не являются ионными каналами; они модифицируют работу ионных каналов, ионных насосов и других белков посредством непрямых механизмов.
- Действие метаботропных рецепторов опосредовано G-белками. Примерами метаботропных рецепторов являются мускариновый ацетилхолиновый рецептор; α- и β-адренорецепторы; определенные рецепторы ГАМК, серотонина, дофамина и глутамата; рецепторы нейропептидов, света и одорантов.
- G-белки являются $\alpha\beta\gamma$-гетеротримерами. В состоянии покоя α-субъединица связана с ГДФ, и все три субъединицы связаны в тримерный комплекс. При активации метаботропного рецептора ГДФ замещается на ГТФ, тример распадается на α-

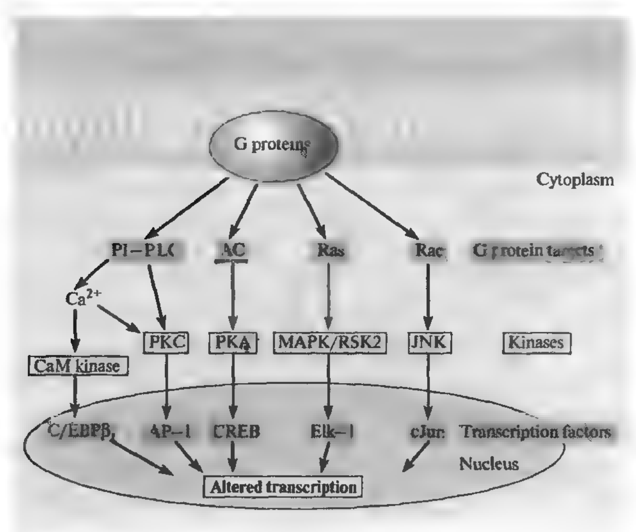


Рис. 10.18. Сигнальные пути, участвующие в регуляции транскрипции G-белками. Активация G-белков метаботропными рецепторами запускает внутриклеточные сигнальные каскады, включая фосфатидилинозитид-специфическую фосфолипазу С (PI-PLC), аденилатциклазу (AC), Ras и Rac, которые, в свою очередь, активируют протеинкиназы. Протеинкиназы фосфорилируют большое количество различных белков-мишеней. Фосфорилирование факторов транскрипции изменяет экспрессию генов и вызывает долговременные изменения в клетке.

Fig. 10.18. G Protein Signaling Pathways Alter Transcription. Activation of G proteins by metabotropic neurotransmitter receptors triggers intracellular signaling cascades involving phosphatidylinositide-specific phospholipase C (PI-PLC), adenylyl cyclase (AC), Ras, and Rac, which activate, in turn, protein kinases. The protein kinases phosphorylate a wide variety of target proteins. Phosphorylation of transcription factors alters gene expression and produces long-lasting changes in the cell.

и $\beta\gamma$-субъединицы, и свободные субъединицы активируют одну или несколько внутриклеточных мишеней. Активность субъединиц G-белка заканчивается с гидролизом ГТФ до ГДП в результате эндогенной ГТФ-азной активности α-субъединицы и рекомбинацией α- и $\beta\gamma$-субъединиц в тримерный комплекс.

- $\beta\gamma$-субъединицы некоторых G-белков связываются напрямую с ионными каналами, увеличивая или уменьшая их активность; α- или $\beta\gamma$-субъединицы других G-белков активируют аденилатциклазу, фосфолипазу С или фосфолипазу A_2, что приводит к образованию внутриклеточных вторичных посредников с широким спектром эффектов.
- Действуя непрямым образом, медиаторы оказывают влияние на работу калиевых и кальциевых каналов. Изменения в работе этих каналов в свою очередь приводят к изменениям потенциала покоя, спонтанной активности, ответов в других синаптических входах, а также в количестве кальция, входящего во время потенциала действия, и, следовательно, в количестве освобождаемого медиатора.
- Изменения в концентрации внутриклеточного кальция или кальций-кальмодулина регулируют работу ионных каналов и активность фосфолипаз С и A_2, протеинкиназы С, кальпаина, аденилатциклазы, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, NO-синтазы. Важными факторами, определяющими действие кальция, являются распределение изменений концентрации кальция внутри клетки, которое может быть очень локальным, а также динамика этих изменений (кальциевые волны и осцилляции).
- Действие медиаторов, опосредованное непрямыми механизмами, может длится от нескольких миллисекунд до нескольких лет. В основе быстрых эффектов лежат изменения в активности ионных каналов; эффекты с промежуточной длительностью опосредованы активацией и фосфорилированием ферментов и других белков; длительные эффекты связаны с регуляцией синтеза белков.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Berridge, M. J. 1998. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13–26.
- Clapham, D. E., and Neer, E. J. 1997. G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 167–203.
- Hamm, H. E. 1998. The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 669–672.
- Hille, B. 1994. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 17: 531–535.
- Kaczmarek, L. K., and Levitan, I. B. (eds.). 1987. *Neuromodulation: The Biochemical Control of Neuronal Excitability.* Oxford University Press, New York.
- Levitan, I. B., and Kaczmarek, L. K. 1997. *The Neuron: Cell and Molecular Biology*, 2nd Ed. Oxford University Press, New York.
- Piomelli, D. 1994. Eicosanoids in synaptic transmission. *Crit. Rev. Neurobiol.* 8: 65–83.
- Schmidt, H. H., and Walter, U. 1994. NO at work. *Cell* 78: 919–925.
- Schulman, H., and Hyman, S. E. 1999. Intracellular signaling. In M. J. Zigmond, F. E. Bloom, S. C. Landis, J. L. Roberts, and L. R. Squire (eds.), *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, New York, pp. 269–316.
- Wess, J. 1998. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* 80: 231–264.

Статьи

- Dunlap, K., and Fischbach, G. D. 1981. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J. Physiol.* 317: 519–535.
- Flockerzi, V., Oeken, H-J., Hofmann, F., Pelzer, D, Cavalié, A., and Trautwein, W. 1986. Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* 323: 66–68.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. 1996. The 2,0 Å crystal structure of a heterotrimetric G protein. *Nature* 379: 311–319.
- Sakmann, B., Noma, A., and Trautwein, W. 1983. Acetylcholine activation of single muscarinic K^+ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature* 303: 250–253.
- Sunahara, R. K., Tesmer, J. J. G., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. 1996. Crystal structure of the adenylyl cyclase activator $G_{s\alpha}$. *Science* 278: 1943–1947.
- Tesmer, J. J. G., Sunahara, R. K., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with $G_{s\alpha} \cdot GTP\gamma S$. *Science* 278: 1907–1916.
- Wickmann, K. D., Iñiguez-Lluhi, J. A., Davenport, P. A., Taussing, R., Krapivinsky, G. B., Linder, M. E., Gilman, A. G., and Clapham, D. E. 1994. Recombinant G-protein $\beta\gamma$-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* 368: 255-257.

Цитированная литература

1. Dunlap, K., Holz, G. G., and Rane, S. G. 1987. *Trends Neurosci.* 10: 244–247.
2. McDonald, T. F., et al. 1994. *Physiol. Rev.* 74: 365–507.
3. de la Villa, P., Kurahashi, T., and Kaneko, A. 1995. *J. Neurosci.* 15: 3571–3582.
4. Ji, T. H., Grossmann, M., and Ji, I. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 17299–17302.
5. Wess, J. 1997. *FASEB J.* 11: 346–354.
6. Wess, J. 1998. *Pharmacol. Ther.* 80: 231–264.
7. Hamm, H. E. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 669–672.
8. Ross, E. M. 1989. *Neuron* 3: 141–152.
9. Clapham, D. E., and Neer, E. J. 1997. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 167–203.
10. Gautam, N., et al. 1998. *Cell. Signalling* 10: 447–455.
11. Berman, D. M., and Gilman, A. G. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 1269–1272.
12. Lambright, D. G., et al. 1996. *Nature* 379: 311–319.
13. Tesmer, J. J. G., et al. 1997. *Science* 278: 1907–1916.
14. Sunahara, R. K., et al. 1997. *Science* 278: 1943–1947.
15. Lefkowitz, R. J. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 18677–18680.
16. Birnbaumer, L., Abramowitz, J., and Brown, A. M. 1990. *Biochim. Biophys. Acta* 1031: 163–224.
17. Sakmann, B., Noma, A., and Trautwein, W. 1983. *Nature* 303: 250–253.
18. Brown, A. M., and Birnbaumer, L. 1990. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 197–213.
19. Szabo, G., and Otero, A. S. 1990. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 293–305.
20. Pfaffinger, P. J., et al. 1985. *Nature* 317: 536–538.
21. Breitwieser, G. E., and Szabo, G. 1985. *Nature* 317: 538–540.
22. Wickman, K. D., et al. 1994. *Nature* 368: 255–257.
23. Reuveny, E., et al. 1994. *Nature* 370: 143–146.

24. Huang, C.-L., et al. 1995. *Neuron* 15: 1133–1143.
25. Soejima, M., and Noma, A. 1984. *Pflügers Arch.* 400: 424–431.
26. Lipscombe, D., Kongsamut, S., and Tsien, R. W. 1989. *Nature* 340: 639–642.
27. Hirning, L. D., et al. 1988. *Science* 239: 57–61.
28. Ikeda, S. R. 1996. *Nature* 380: 255–258.
29. Herlitze, S., et al. 1996. *Nature* 380: 258–262.
30. Tsien, R. W. 1987. In *Neuromodulation: The Biochemical Control of Neuronal Excitability.* Oxford University Press, New York, pp. 206–242.
31. Reuter, H., et al. 1983. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 48: 193–200.
32. Tsien, R. W., et al. 1983. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 48: 201–212.
33. Taussig, R., and Gilman, A. G. 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 1–4.
34. Tang, W.-J., and Gilman, A. G. 1991. *Science* 254: 1500–1503.
35 Curtis, B. M., and Catterall, W. A. 1986. *Biochemistry* 25: 3077–3083.
36. Flockerzi, V., et al. 1986. *Nature* 323: 66–68.
37. Dolphin, A. C. 1990. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 243–255.
38. Dunlap, K., and Fischbach, G. D. 1981. *J. Physiol.* 317: 519–535.
39. Mudge, A. W., Leeman, S. E., and Fischbach, G. D. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 526–530.
40. Berridge, M. J. 1998. *Neuron* 21: 13–26.
41. Miyazaki, S. 1995. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 190–196.
42. Bazan, N. G. 1999. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 6th Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 731–741.
43. Fraser, D. D., et al. 1993. *Neuron* 11: 633–644.
44. Fink, M., et al. 1998. *EMBO J.* 17: 3297–3308.
45. Majewski, H., and Iannazzo, L. 1998. *Prog. Neurobiol.* 55: 463–475.
46. Piomelli, D. 1994. *Crit. Rev. Neurobiol.* 8: 65–83.
47. Piomelli, D., et al. 1987. *Nature* 328: 38–43.
48. Buttner, N., Siegelbaum, S. A., and Volterra, A. 1989. *Nature* 342: 553–555.
49. Pieroni, J. P., and Byrne, J. H. 1992. *J. Neurosci.* 12: 2633–2647.
50. Belkin, K. J., and Abrams, T. W. 1993. *J. Neurosci.* 13: 5139–5152.
51. Ignarro, L. J. 1990. *Pharmacol. Toxicol.* 67: 1–7.
52. Schmidt, H. H., and Walter, U. 1994. *Cell* 78: 919–925.
53. Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. 1980. *Nature* 288: 373–376.
54. Bredt, D. S., and Snyder, S. H. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9030–9033.
55. Garthwaite, J., et al. 1989. *Eur. J. Pharmacol.* 172: 413–416.
56. Snyder, S. H., Jaffrey, S. R., and Zakhary, R. 1998. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26: 167–175.
57. Daniel, H., Levenes, C., and Crepel, F. 1998. *Trends Neurosci.* 21: 401–407.
58. Savchenko, A., Barnes, S., and Kramer, R. H. 1997. *Nature* 390: 694–698.
59. Hawkins, R. D., Zhuo, M., and Arancio, O. 1994. *J. Neurobiol.* 25: 652–665.
60. Park, J. H., Straub, V. A., and O'Shea, M. 1998. *J. Neurosci.* 18: 5463–5476.
61. Wang, R. 1998. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76: 1–15.
62. Leonard, J. P., and Wickelgren, W. O. 1986. *J. Physiol.* 375: 481–497.
63. Hille, B. 1994. *Trends Neurosci.* 17: 531–536.
64. Lipscombe, D., et al. 1988. *Neuron* 1: 355–365.
65. Tsien, R. W., and Tsien, R. Y. 1990. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 715–760.
66. Lewis, R. S. 1999. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 33: 279–307.
67. Putney, J. W., Jr., and McKay, R. R. 1999. *BioEssays* 21: 38–46.
68. Ross, W. N., Arechiga, H., and Nicholls, J. G. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4075–4078.
69. Bacskai, B. J., et al. 1995. *Neuron* 14: 19–28.
70. Tucker, T., and Fettiplace, R. 1995. *Neuron* 15: 1323–1335.
71. Llinôs, R., Sugimori, M., and Silver, R. B. 1995. *J. Physiol. (Paris)* 89: 77–81.
72. Meyer, T., and Stryer, L. 1991. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20: 153–174.
73. Cheng, H., et al. 1996. *Am. J. Physiol.* 270: C148–159.
74. DeKoninck, P., and Schulman, H. 1998. *Science* 279: 227–230.
75. Fuchs, P. A., and Murrow, B. W. 1992. *J. Neurosci.* 12: 800–809.
76. Wong, L. A., and Gallagher, J. P. 1991. *J. Physiol.* 436: 325–346.
77. Marty, A. 1989. *Trends Neurosci.* 12: 420–424.
78. Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. 1997. *Biochem. J.* 328: 721–732.
79. Johnson, G. V., and Guttmann, R. P. 1997. *BioEssays* 19: 1011–1018.
80. Vogel, H. J. 1994. *Biochem. Cell Biol.* 72: 357–376.
81. Ghosh, A., and Greenberg, M. E. 1995. *Science* 268: 239–247.
82. Casey, P. J., et al. 1988. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 53: 203–208.
83. Miller, S. G., and Kennedy, M. B. 1986. *Cell* 44: 861–870.
84. Gutkind, J. S. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 1839–1842.
85. Schulman, H., and Hyman, S. E. 1999. In *Fundamental Neuroscience.* Academic Press, New York, pp. 269–316.
86. Heist, E. K., and Schulman, H. 1998. *Cell Calcium* 23: 103–114.
87. Tischmeyer, W., and Grimm, R. 1999. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 564–574.

Глава 11

Высвобождение медиатора

Стимулом для высвобождения медиатора из терминали является деполяризация нервного окончания. Высвобождение происходит в результате входа ионов кальция в нервное окончание через потенциалзависимые кальциевые каналы. Медиатор высвобождается примерно через 0,5 мс после пресинаптической деполяризации. Эта задержка обусловлена временем, необходимым для открывания кальциевых каналов и кальций-зависимого высвобождения медиатора.

Медиатор высвобождается мультимолекулярными пакетами (квантами), каждый из которых содержит несколько тысяч молекул медиатора. От 1 до 300 квантов (в зависимости от типа синапса) выделяется практически одновременно из нервного окончания в ответ на потенциал действия. В состоянии покоя нервные окончания также высвобождают кванты спонтанно, хотя и с низкой частотой, вызывая в постсинаптической клетке миниатюрные синаптические потенциалы. Помимо этого, в состоянии покоя небольшое количество медиатора высвобождается из нервного окончания неквантовым образом, в виде постоянной утечки.

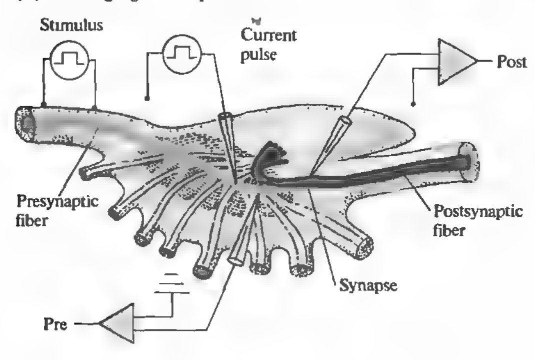
Один квант нейромедиатора соответствует содержимому одной синаптической везикулы — нескольким тысячам молекул медиатора с низким молекулярным весом. Высвобождение осуществляется посредством экзоцитоза, в результате которого происходит слияние мембраны синаптической везикулы с пресинаптической мембраной и содержимое везикулы высвобождается в синаптическую щель. Компоненты везикулярной мембраны впоследствии эндоцитируются, сортируются в эндосомах и используются для образования новых синаптических везикул.

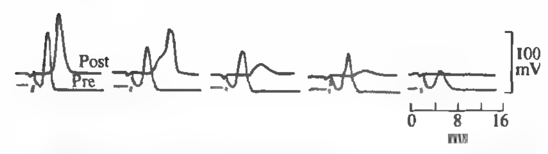
При рассмотрении процесса высвобождения медиатора пресинаптическими нейронами возникает большое количество вопросов. Для того чтобы ответить на эти вопросы, требуются экспериментальные подходы для определения количества высвобождаемого медиатора с временным разрешением в миллисекундном диапазоне. Во многих экспериментах, представленных в этой главе, эти измерения производились путем измерения мембранного потенциала постсинаптической клетки. Удобным препаратом для исследования процесса высвобождения медиатора является нервно-мышечное соединение позвоночных, в котором медиатором является АХ. Однако для получения более полной информации о процессе высвобождения необходимо также иметь возможность регистрировать непосредственно от пресинаптических окончаний; это необходимо, например, для того, чтобы определить, каким образом кальций и мембранный потенциал влияют на процесс высвобождения. Пресинаптические окончания в нервно-мышечном соединении позвоночных слишком малы для электрофизиологической регистрации (Морита и Баррет, 1990[1]). Однако эта регистрация может быть осуществлена в других синапсах, например, гигантском синапсе звездчатого ганглия кальмара[2], гигантских окончаниях биполярных клеток сетчатки золотой рыбки[3], а также в калициформных синапсах цилиарного ганглия птиц[4] и стволе мозга грызунов[5]. Более того, некоторые новые методики позволяют исследовать высвобождение медиатора без регистрации от постсинаптической клетки. В этой главе будут рассмотрены электрофизиологические и морфологические эксперименты, которые характеризуют процесс высвобождения. Белки, которые участвуют в высвобождении медиатора, будут описаны в главе 13.

§ 1. Основные свойства процесса высвобождения медиатора

Деполяризация нервных окончаний и высвобождение медиатора

Звездчатый ганглий кальмара был использован в экспериментах Катца и Миледи для исследования зависимости между мембранным потенциалом на нервном окончании и количеством высвобождаемого медиатора[6]. Препарат и экспериментальный дизайн для одновременной регистрации от нервного окончания и постсинаптического волокна изображены на рис. 11.1А. После добавления тетродотоксина (ТТХ) в наружный раствор пресинаптический потенциал действия постепенно уменьшается в течение 15 минут (рис. 11.1В).





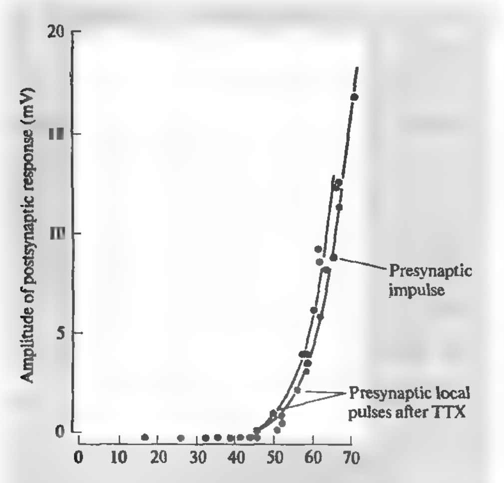


Рис. 11.1. Пресинаптический импульс и постсинаптический ответ в гигантском синапсе кальмара. (А) Схема звездчатого ганглия кальмара, изображающая два больших аксона, которые образуют химический синапс. В оба аксона введены микроэлектроды. (В) Одновременная регистрация пресинаптических аксонов (серая линия) и постсинаптических аксонов (черная линия) в процессе развития блока проведения тетродотоксином. По мере уменьшения амплитуды пресинаптических потенциалов действия уменьшается также и постсинаптический потенциал. (Обратите внимание, что два первых ответа вызывают постсинаптический потенциал действия.) (С) Зависимость амплитуды постсинаптического потенциала от амплитуды пресинаптического потенциала. Черными кружками представлены результаты, показанные на части В; серыми кружками представлены результаты, полученные при нанесении деполяризующих пульсов тока на пресинаптическое окончание после полного блокирования потенциала действия тетродотоксином.

Fig. 11.1. Presynaptic Impulse and Postsynaptic Response at a squid giant synapse. (A) Sketch of the stellate ganglion of the squid, illustrating the two large axons that form a chemical synapse. Both axons can be impaled with microelectrodes as shown. (B) Simultaneous recordings from the presynaptic axons (black records) and postsynaptic axons (grey records) during the development of conduction block by TTX. As the amplitude of the presynaptic action potential decreases, so does the size of the postsynaptic potential. (Note that the two largest presynaptic action potentials evoke postsynaptic action potentials.) (C) The relation between the amplitude of the presynaptic action potential and the postsynaptic potential. Grey circles represent results in B; black circles represent results obtained by applying depolarizing current pulses to the presynaptic terminals after complete TTX block. (A after Bullock and Hagiwara, 1957; B and C after Katz and Miledi, 1977c.)

Постсинаптический потенциал действия также постепенно уменьшается и в определенный момент полностью исчезает, так как возбуждающий постсинаптический потенциал (ВПСП) перестает достигать порога потенциала действия. С этого момента по амплитуде синаптического потенциала можно судить о количестве высвобождаемого медиатора.

График зависимости амплитуды возбуждающего постсинаптического потенциала от амплитуды пресинаптического импульса представлен на рис. 11.1С. Синаптический потенциал уменьшается при снижении амплитуды пресинаптического потенциала действия менее 75 мВ, а если амплитуда пресинаптического импульса становится меньше 45 мВ, то постсинаптический ответ вовсе пропадает. Тетродотоксин не влияет на чувствительность постсинаптической мембраны к медиатору; поэтому снижение амплитуды синаптического потенциала связано с уменьшением количества медиатора, выделяемого из пресинаптического окончания. Таким образом, деполяризация на 45 мВ является пороговым значением для высвобождения медиатора; при еще большем увеличении амплитуды пресинаптического потенциала действия возрастают количество высвобождаемого медиатора и амплитуда ВПСП.

Для того, чтобы исследовать эту зависимость в деталях, Катц и Миледи провели следующий эксперимент: они ввели в пресинаптическое окончание второй электрод, через который подавались короткие (1–2 мс) деполяризующие толчки тока с целью имитировать пресинаптический потенциал действия. Зависимость амплитуды синаптического потенциала от амплитуды симулируемых пресинаптических потенциалов действия оказалась такой же, как и в случае настоящих потенциалов действия (см. рис. 11.1С). Этот результат свидетельствует о том, что ионные потоки натрия и калия, ответственные за генерацию потенциала действия, не являются обязательным фактором для высвобождения медиатора и что процесс высвобождения запускается деполяризацией.

Синаптическая задержка

Одной из характерных особенностей процесса высвобождения медиатора является синаптическая задержка — время между началом пресинаптического потенциала действия и началом синаптического потенциала (рис. 11.1В; глава 9). В приведенных выше экспериментах на гигантском аксоне кальмара, которые проводились при температуре около 10° С, задержка состааляла около 3–4 мс. В нервно-мышечном соединении лягушки синаптическая задержка составляет 0,5 мс при комнатной температуре (рис. 11.2)[7]. Эта задержка значительно превышает время (около 50 мкс), необходимое для диффузии АХ через синаптическую шель (расстояние около 50 нм). При ионофоретической аппликации АХ на постсинаптическую мембрану из пипетки задержка может составлять всего 150 мс. Более того, синаптическая задержка гораздо более чувствительна к температуре, чем процесс диффузии. Охлаждение нервно-мышечного препарата до 2° С увеличивает задержку до 7 мс (рис. 11.2В), в то время как задержка на ответ, вызываемый ионофоретической аппликацией АХ, значительно не меняется. Таким образом, основная причина задержки кроется в механизме высвобождения медиатора[8].

Значение кальция для процесса высвобождения

Кальций был давно известен как важное звено в процессе синаптической передачи. При уменьшении концентрации кальция в наружном растворе уменьшается также и высвобождение АХ в нервно-мышечном соединении, вплоть до полного блокирования постсинаптических ответов[9, 10]. Кальций играет важную роль в высвобождении медиатора во всех синапсах независимо от природы медиатора (одним из исключений является высвобождение ГАМК из горизонтальных клеток в сетчатке рыб, см. главу 4[11]). Было также показано, что кальций играет важную роль в процессах секреции в целом, как, например, в высвобождении гормонов клетками гипофиза, выделении норадреналина из мозгового вещества надпочечников и секреции из слюноотделительных желез[12, 13]. Как будет показано в следующем разделе, вызванному высвобождению медиатора предшествует вход кальция в пресинаптическое окончание, причем высвобождение может быть заблокировано ионами, которые препятствуют вхождению кальция, например, магнием, кадмием, никелем, марганцем и кобальтом. Следовательно, высвобождение медиатора можно уменьшить, либо устранив кальций из наружного раствора, либо добавив в него блокирующие ионы. Медиатор высвобождается только в том случае, если

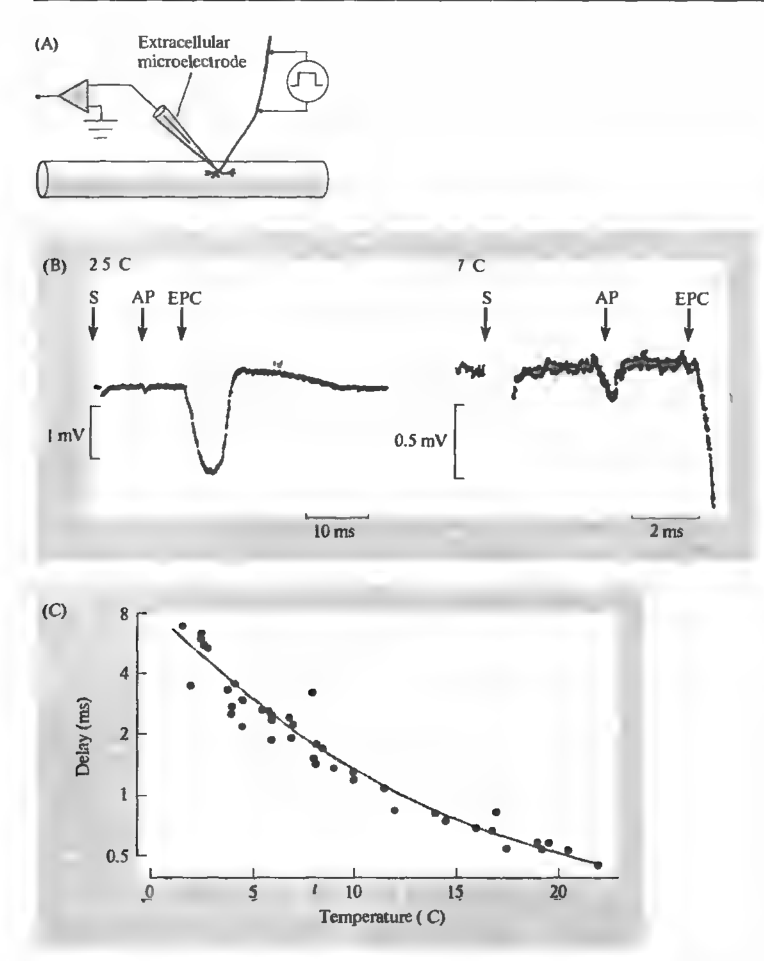


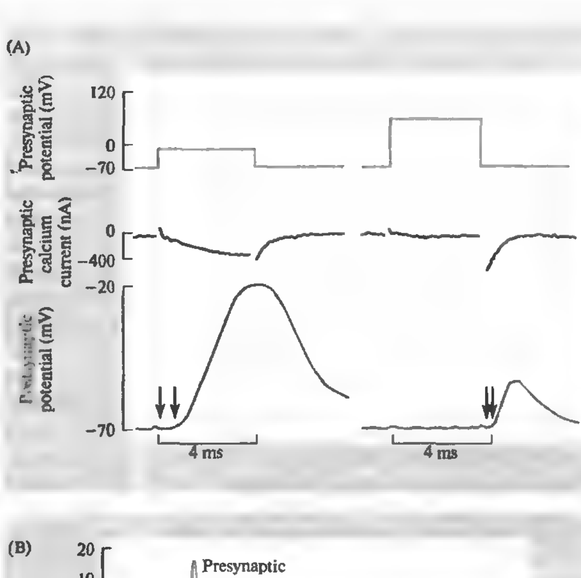
Рис. 11.2. Синаптическая задержка в химическом синапсе. (А) Ответы, вызываемые электрической стимуляцией двигательного нерва, регистрируются с помощью внеклеточного микроэлектрода в нервно-мышечном соединении лягушки. (В) Экстраклеточная регистрация артефакта стимуляции (S), потенциал действия окончания аксона (АР) и тока концевой пластинки (ЕРС) при 2,5 и 7° С. Синаптическая задержка — это время между потенциалом действия в нервном окончании и началом тока концевой пластинки. Обратите внимание, что ток, входящий в нервное окончание и мышечное волокно, регистрируется внеклеточным микроэлектродом в виде отрицательных потенциалов. (С) График зависимости синаптической задержки от температуры; чем выше температура, тем короче синаптическая задержка.

Fig. 11.2. Synaptic Delay at a Chemical Synapse. (A) The motor nerve is stimulated while recording with an extracellular microelectrode at the frog neuromuscular junction. (B) Extracellular recordings of the stimulus artifact (S), the axon terminal action potential (AP), and the end-plate current (EPC) at 2,5 and 7° C. The synaptic delay is the time between the action potential in the nerve terminal and the beginning of the end-plate current. Note that the current flowing into the nerve terminal or the muscle fiber is recorded as a negative potential by an extracellular microelectrode. (C) Plot of synaptic delay as a function of temperature; the higher the temperature, the briefer the synaptic delay. (After Katz and Miledi, 1965.)

кальций присутствует в наружном растворе в момент деполяризации пресинаптического окончания[14].

Измерение входа кальция в пресинаптическое нервное окончание

В ходе дальнейших экспериментов было выявлено, что проводимость мембраны для ионов кальция увеличивается при деполяризации и что кальций входит в окончание с каждым потенциалом действия. Ллинас с сотрудниками измерили амплитуду и временной ход кальциевого тока, вызываемого пресинаптической деполяризацией в гигантском синапсе кальмара. Пример такого эксперимента показан на рис. 11.3А. Натриевая и калиевая проводимости, связанные с потенциалом действия, были заблокированы ТТХ и ТЭА (тетраэтиламмонием), таким образом, только потенциалзависимые кальциевые каналы оставались функциональными. Деполяризация пресинаптического окончания до −18 мВ



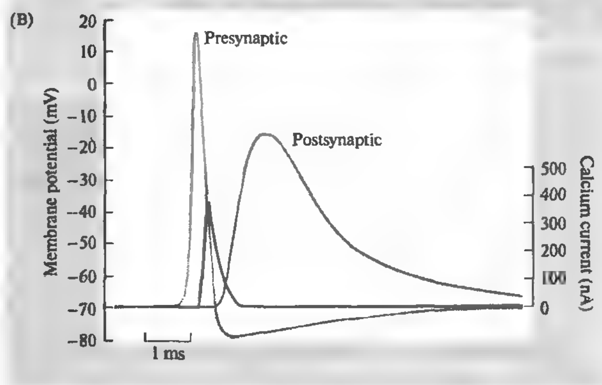


Рис. 11.3. Пресинаптический кальций и высвобождение медиатора в гигантском синапсе кальмара (A, B). Потенциал на пресинаптическом окончании фиксируется на заданном уровне, а потенциал-активируемые натриевые и калиевые токи заблокированы тетродотоксином и тетраэтиламмонием. (A) На верхних записях показан командный потенциал, прикладываемый к пресинаптическим волокнам, в середине — пресинаптический кальциевый ток, внизу — возбуждающий постсинаптический потенциал (ВПСП) в постсинаптическом волокне. Толчок потенциала от −70 до −18 мВ (слева) вызывает медленный входящий кальциевый ток, за которым с задержкой около 1 мс (отмеченной стрелками) следует ВПСП. Деполяризация до +60 мВ (справа) подавляет вход кальция. В конце импульса возникает волна кальциевого тока, за которой с задержкой около 0,2 мс следует ВПСП. (B) Если в условиях фиксации потенциала вызвать такое же по форме изменение мембранного потенциала, как во время нормального потенциала действия (отметка Presynaptic), то возникающий при этом ВПСП невозможно отличить от ВПСП, возникающего в физиологических условиях (отметка Postsynaptic). Амплитуда и временной ход кальциевого тока показаны черной линией. Синаптическая задержка между началом пресинаптической деполяризации и началом постсинаптического ответа отчасти обусловлена временем, затрачиваемым на открывание кальциевых каналов, а также на то, чтобы вошедший кальций запустил высвобождение медиатора.

Fig. 11.3. Presynaptic Calcium and Transmitter Release at the squid giant synapse. (A, B) The presynaptic terminal is voltage-clamped and treated with TTX and TEA to abolish voltage-activated sodium and potassium currents (A). Records show potentials applied to the presynaptic fiber (upper trace), presynaptic calcium current (middle trace), and EPSP in the postsynaptic fiber (lower trace). A voltage pulse from −70 to −18 mV (left panel) results in a slow inward calcium current and, after a delay of about 1 ms (arrows), an EPSP. A larger depolarization, to +60 mV (right panel), suppresses calcium entry. At the end of the pulse, a surge of calcium current is followed within about 0,2 ms (arrows) by an EPSP. (B) If a voltage change identical in shape to a normal action potential is produced by the voltage clamp (labeled Presynaptic), then the EPSP is indistinguishable from that seen normally (labeled Postsynaptic). The black curve gives the magnitude and time course of the calcium current. The synaptic delay between the beginning of presynaptic depolarization and the beginning of postsynaptic response is due in part to the time required to open calcium channels and in part to the time for calcium entry to trigger transmitter release. (After Llinás, 1982.)

(верхняя запись слева) вызывала входящий кальциевый ток в окончание, который медленно увеличивался примерно до 400 нА (средняя запись), а также синаптический потенциал большой амплитуды в постсинаптической клетке (нижняя запись). Если окончание деполяризовалось до +60 мВ, что примерно соответствует равновесному потенциалу кальция, то кальциевый ток и синаптический потенциал подавлялись во время деполя-

ризационного толчка (см. записи справа). Это доказывает, что деполяризация окончания сама по себе не является достаточным условием для высвобождения медиатора; необходимо также, чтобы произошел вход ионов кальция. При реполяризации наблюдался кратковременный кальциевый ток, как если бы кальций входил через каналы, которые открылись во время деполяризации, и это сопровождалось небольшим постсинаптическим потенциалом.

Эффект искусственного потенциала действия показан на рис. 11.3В. Пресинаптический потенциал действия, записанный до добавления ТТХ и ТЭА, был «воспроизведен» электрической цепью фиксации потенциала, с тем чтобы вызвать точно такое же изменение потенциала в окончании. Постсинаптический потенциал при этом не отличается от ответа, вызванного нормальным пресинаптическим потенциалом действия, подтверждая тот факт, что натриевые и калиевые токи, которые в норме участвуют в генерации потенциала действия, не являются необходимым условием для высвобождения медиатора.

Использование методики фиксации потенциала также позволило измерить амплитуду и временной ход кальциевого тока, вызываемого искусственным потенциалом действия (кривая черного цвета на рис. 11.3В). Кальциевый ток начинается примерно через 0,5 мс после начала пресинаптической деполяризации, а постсинаптический потенциал начинается еще через 0,5 мс. Таким образом, время, необходимое для деполяризации пресинаптического окончания и для открывания кальциевых каналов, составляет первую половину синаптической задержки; оставшаяся часть задержки уходит на возрастание концентрации кальция в окончании и высвобождение медиатора.

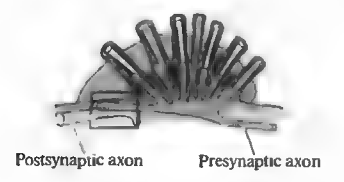


Рис. 11.4. (Рис. 11.4А и 11.4В см. на цветной вклейке после с. 640.) Микродомены кальция в пресинаптическом окончании в гигантском синапсе кальмара. (А) Распределение кальция внутри пресинаптического окончания аксона в покое, определенное с помощью внутриклеточной инъекции кальций-чувствительной метки (квадратом на рисунке слева отмечен участок, в котором проводится измерение кальция). (В) Короткая серия пресинаптических потенциалов действия вызывает появление микродоменов с высокой концентрацией кальция внутри окончания аксона.

Fig. 11.4. Microdomains of Calcium within the Presynaptic Terminal at the Squid Giant Synapse. (A) Distribution of calcium within the presynaptic axon terminal at rest, determined by intracellular injection of a calcium-sensitive dye (box in illustration at left shows the region imaged). (B) A brief train of presynaptic action potentials results in the appearance of microdomains of high calcium concentration within the axon terminal. (After Llinas, Sugimori, and Silver, 1992; micrographs kindly provided by R. Llinas.)

Ллинас с сотрудниками также непосредственно наблюдали вход кальция, используя люминесцентную метку экворин[15, 16]. Они обнаружили, что в результате короткой серии пресинаптических потенциалов действия внутриклеточная концентрация кальция достигает от 100 до 200 мкмоль в микродоменах внутри окончания (рис. 11.4), которые, по всей видимости, соответствуют активным зонам (глава 9).

Локализация мест входа кальция

Эксперименты на гигантском синапсе кальмара дали дополнительную информацию о роли кальция в высвобождении и, в частности, о близком расположении кальциевых каналов к местам секреции медиатора[17]. В этих экспериментах введение ВАРТА — сильного кальциевого буфера — в пресинаптическое окончание вызывало значительное уменьшение количества высвобождаемого медиатора без какого-либо существенного изменения потенциала действия (рис. 11.5А). С другой стороны EGTA — другой кальциевый буфер — обладал лишь небольшим эффектом на высвобождение (рис. 11.5С). Это различие связано с тем, что связывание кальция с ВАРТА происходит намного быстрее, чем с EGTA. Таким образом, у кальциевых ионов остается незначительная возможность для диффузии от места входа, прежде чем они свяжутся с ВАРТА; в то же время ионы кальция могут проходить более значительные расстояния, прежде чем будут связаны с EGTA (рис. 11.5В и D). По скорости диффузии кальция и его связыванию с EGTA можно рассчитать, что место связывания кальция, связанное с процессом высвобождения, должно находиться в пределах 100 нм от места входа кальция. С другой стороны, было показано, что EGTA

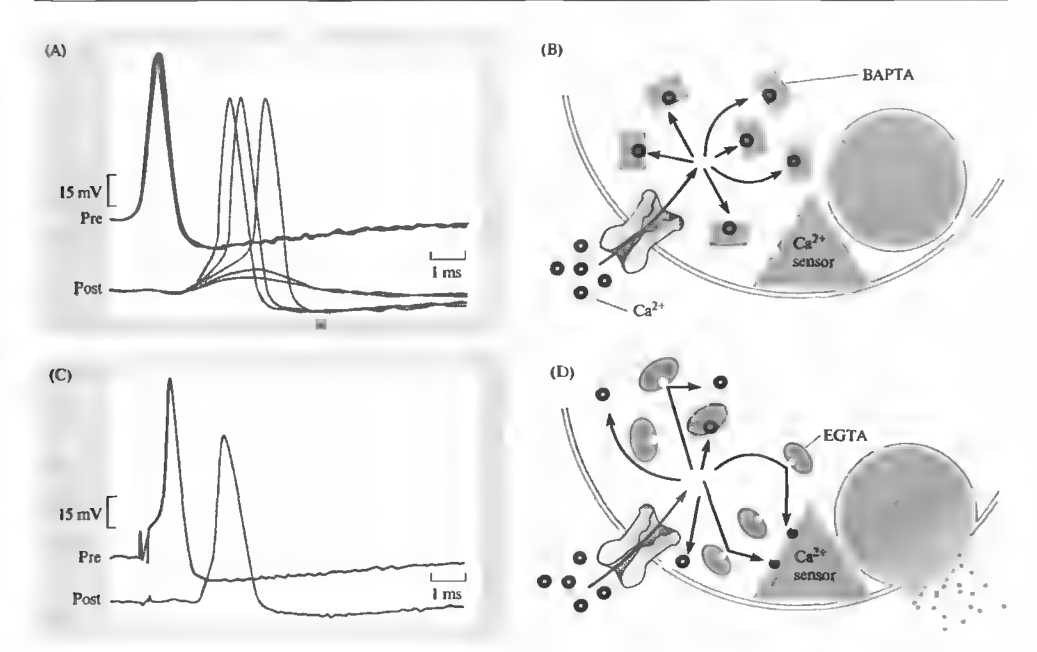


Рис. 11.5. Кальций входит около мест высвобождения медиатора в гигантском синапсе кальмара. (A) Внутриклеточная регистрация от пре- и постсинаптического аксонов после инъекции быстрого кальциевого хелатора ВАРТА. Наложенные друг на друга записи показывают уменьшение ВПСП в течение 4-х минут после инъекции ВАРТА. (B) ВАРТА связывает кальций до того, как он достигает «кальциевого сенсора», который запускает высвобождение медиатора. (C) Наложенные друг на друга внутриклеточные записи, полученные в течение 4-х минут инъекции EGTA — хелатора, который связывает кальций гораздо медленнее. Амплитуда ВПСП не изменяется. (D) Кальций достигает «кальциевого сенсора», который запускает высвобождение медиатора, быстрее, чем с ним свяжется EGTA; это указывает на то, что место входа кальция должно быть в пределах 100 нм от места, в котором кальций запускает высвобождение медиатора.

Fig. 11.5. Calcium Enters Near the Site of Transmitter Release at the squid giant synapse. (A) Intracellular recordings from the pre- and postsynaptic axons following injection of the fast calcium chelator BAPTA. Superimposed traces show the reduction in the EPSP during a 4 min BAPTA injection. (B) BAPTA binds calcium before it has time to reach the calcium sensor that triggers release. (C) Superimposed intracellular recordings during a 4 min injection of EGTA, a chelator that binds calcium more slowly. No change in EPSP amplitude is seen. (D) Calcium reaches the sensor that triggers release faster than it becomes bound to EGTA, indicating that the site of calcium entry must be within 100 nm of the site at which calcium triggers transmitter release. (A and C after Adler et al., 1991.)

может влиять на высвобождение медиатора в некоторых синапсах; это предполагает, что в этих клетках кальций может диффундировать на большие расстояния от кальциевых каналов до мест, в которых инициирется высвобождение медиатора[5].

Роль деполяризации в высвобождении медиатора

Представленные до сих пор доказательства указывают на то, что высвобождение медиатора запускается увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция, которая происходит при деполяризации пресинаптического окончания и открывании потенциалзависимых кальциевых каналов. Данная гипотеза была проверена с помощью так называемого "caged calcium" — буфера, который высвобождает кальций при облучении ультрафиолетовым светом[18)—20)]. При инъекции нитрофена (одна из форм "caged calcium") в пресинаптическое окончание гигантского синапса кальмара или нервно-мышечное соединение рака облучение окончания вызывало высвобождение медиатора (рис. 11.6). Для высвобождения такого же количества медиатора, как и при синаптическом потенциале

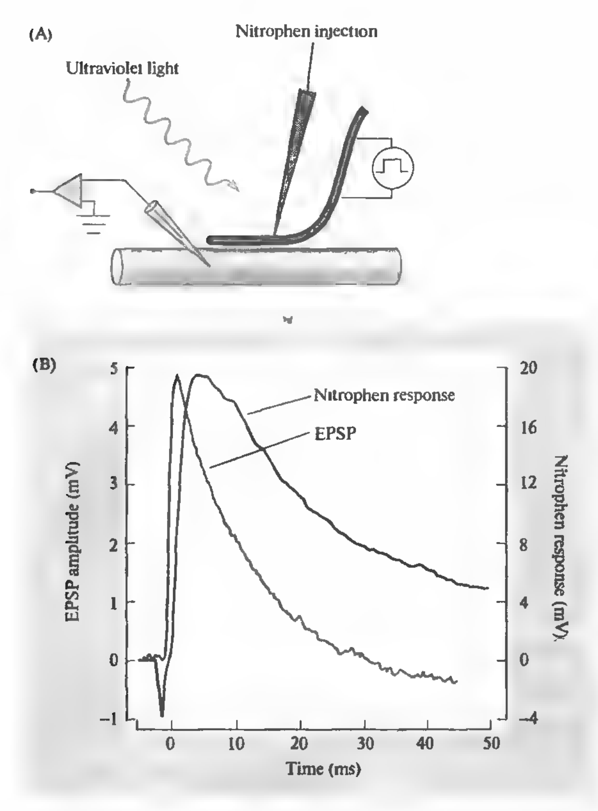


Рис. 11.6. Увеличение внутриклеточного кальция достаточно для того, чтобы вызвать быстрое высвобождение медиатора в гигантском синапсе кальмара. (A) Нитрофен (вещество, которое высвобождает кальций при облучении ультрафиолетом) инъецирован в пресинаптическое окончание. Высвобождение медиатора регистрируется с помощью внутриклеточного отведения от постсинаптического аксона. (B) Внутриклеточные постсинаптические ответы, вызванные стимуляцией нерва (ВПСП) и высвобождением кальция из нитрофена под действием вспышки ультрафиолетового света (nitrophen response). Резкое увеличение внутриклеточного кальция вызывает увеличение освобождения медиатора почти такое же быстрое, как при прохождении пресинаптического потенциала действия. Спад ответа, вызванного нитрофеном, медленный и неполный, поскольку после фотолиза нитрофен удерживает концентрацию кальция на более высоком уровне, чем в нормальных условиях.

Fig. 11.6. An Increase in Intracellular Calcium Is Sufficient to Trigger Rapid Transmitter Release at the squid giant synapse. (A) Nitrophen, a form of "caged calcium," is injected into the presynaptic terminal. Transmitter release is monitored by recording intracellularly from the postsynaptic axon. (B) Intracellular records show the postsynaptic response to nerve stimulation (EPSP) and to release of calcium from nitrophen by a flash of ultraviolet light (nitrophen response). An abrupt increase in intracellular calcium causes an increase in transmitter release that is nearly as rapid as that produced by a presynaptic action potential. The decay of the nitrophen response is slower and incomplete because the photolyzed nitrophen buffers calcium to a concentration higher than the normal level at rest. (B after Zucker, 1993.)

действия, было необходимо, чтобы внутриклеточная концентрация кальция возрастала примерно до 100 мкмоль. В экспериментах на окончаниях биполярных клеток из сетчатки золотой рыбки были получены схожие результаты[21)].

В тоже время некоторые свойства процесса высвобождения не могут быть объяснены лишь на основании входа кальция в нервное окончание. Эти свойства были исследованы в нервномышечных синапсах рака и лягушки, и было обнаружено, что при удержании внутриклеточной концентрации кальция на постоянном повышенном уровне и блокировании дополнительного входа кальция деполяризация может вызывать высвобождение медиатора[8)]. Место действия деполяризации не установлено; одним из объяснений является то, что деполяризация влияет на потенциалзависимые ауторецепторы в мембране пресинаптического нервного окончания[22)].

§ 2. Квантовое высвобождение медиатора

Исходя из вышесказанного, общая схема высвобождения медиатора может быть представлена в виде следующей цепочки:

Пресинаптическая деполяризация
↓
Вход кальция
↓
Высвобождение медиатора.

Теперь остается показать, каким образом медиатор высвобождается из нервных окончаний. В экспериментах на нервно-мышечном соединении лягушки Фетт и Катц показали, что АХ может высвобождаться из окончаний в виде мультимолекулярных пакетов **«квантов»**[23)]. Последующие эксперименты показали, что каждый квант соответствует при-

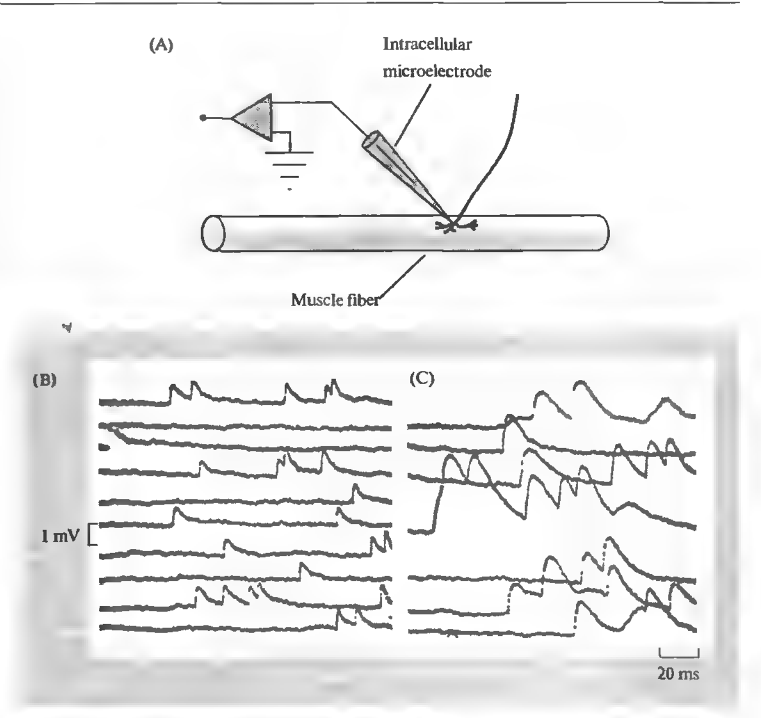


Рис. 11.7. Миниатюрные синаптические потенциалы возникают спонтанно в нервно-мышечном соединении лягушки. (А) Внутриклеточная регистрация мышечного волокна в области двигательной концевой пластинки. (В) Спонтанные миниатюрные синаптические потенциалы имеют амплитуду около 1 мВ и наблюдаются исключительно в области концевой пластинки. (С) После добавления простигмина (ингибитора фермента ацетилхолинэстеразы, которая гидролизует АХ) миниатюрные синаптические потенциалы увеличиваются в амплитуде и длительности, но при этом их частота не изменяется. Это указывает на то, что каждый миниатюрный потенциал является ответом на квантовую порцию АХ, а не ответом на одну молекулу АХ.

Fig. 11.7. Miniature Synaptic Potentials occur spontaneously at the frog neuromuscular junction. (A) Intracellular recording from a muscle fiber in the region of the motor end plate. (B) Spontaneous miniature synaptic potentials are about 1 mV in amplitude and are confined to the end-plate region of the muscle fiber. (C) After addition of prostigmine, which prevents acetylcholinesterase from hydrolyzing ACh, miniature synaptic potentials are increased in amplitude and duration, but the frequency at which they occur is unchanged. This indicates that each miniature is due to a quantal packet of ACh, rather than to a single ACh molecule. (After Fatt and Katz, 1952.)

мерно 7 000 молекул АХ[24]. Следовательно, квантовое высвобождение означает, что только 0, 7 000, 14 000 и так далее молекул может высвобождаться одновременно, а не 4 250 или 10 776. В каждом данном синапсе количество квантов, высвобождаемых из нервного окончания в ответ на потенциал действия (**квантовый состав** синаптического ответа) может значительно варьировать, однако количество молекул в каждом кванте (**размер кванта**) является постоянной величиной (с вариациями в пределах 10 %).

Спонтанное высвобождение квантов медиатора

Первым свидетельством того, что АХ упакован в мультимолекулярные кванты, было то, что в области концевой пластинки наблюдается спонтанная нерегулярная деполяризация с амплитудой около 1 мВ (рис. 11.7)[23]. Временной ход спонтанных деполяризаций совпадал с временным ходом потенциала, вызываемого стимуляцией нерва. Спонтанные миниатюрные потенциалы (МПКП, миниатюрные потенциалы концевой пластинки) уменьшались по амплитуде вплоть до полного исчезновения по мере увеличения концентрации антагониста АХ рецептора кураре, в то время как ингибиторы ацетилинхолинэстеразы (например, простигмин) увеличивали амплитуду и замедляли временной ход МПКП (рис. 11.7С). Эти два фармакологических теста указывают на то, что МПКП генерируется в результате спонтанного высвобождения дискретных количеств АХ из нервного окончания, и исключают возможность того, что МПКП генерируется одиночными молекулами АХ. Впоследствии регистрация с помощью пэтч-электродов позволила непосредственно определить, что количество тока, протекающего через один АХ рецептор, должно вызывать деполяризацию мышечного

волокна приблизительно на 1 мкВ (глава 2). Следовательно, в генерации каждого спонтанного МПКП участвует более тысячи АХ рецепторов. Были получены также дополнительные доказательства того, что спонтанные миниатюрные потенциалы являются ответом на мультимолекулярные пакеты АХ, выделяемые нервным окончанием. Например, деполяризация нервного окончания, вызываемая постоянным током, приводит к увеличению частоты спонтанной активности, в то время как деполяризация мышцы не влияет на частоту[25]. Ботулиновый токсин, который блокирует высвобождение АХ в ответ на стимуляцию нерва, блокирует также и спонтанную активность[26]. Вскоре после денервации мышцы двигательное нервное окончание дегенерирует, что сопровождается исчезновением миниатюрных потенциалов[27]. Интересно, что по прошествии короткого промежутка времени спонтанные потенциалы вновь появляются в денервированной мышце лягушки; они возникают в результате высвобождения АХ шванновскими клетками, которые поглощают участки дегенерирующих нервных окончаний путем фагоцитоза[28].

Неквантовое высвобождение

В дополнение к квантовой форме высвобождения, некоторое количество АХ также постоянно «утекает» из цитоплазмы во внеклеточное пространство в неквантовой форме[29, 30]. В действительности, общее количество АХ, который утекает из нервного окончания в виде неквантового высвобождения, примерно в 100 раз больше, чем количество АХ, выделяемого в виде спонтанных квантов. Это соотношение может быть определено путем сравнения общего количества высвобождаемого из мышцы АХ, измеренного биохимическими методами, с количеством АХ, высвобождаемого в виде квантов, рассчитанным по частоте МПКП с учетом общего количества концевых пластинок на мышце.

В физиологических условиях утечка АХ из пресинаптических окончаний в неквантовой форме не вызывает постсинаптического ответа: количество холинэстеразы в синаптической щели достаточно для того, чтобы гидролизовать столь незначительное количество АХ, предотвращая таким образом активацию рецепторов на постсинаптической мембране. Постсинаптический эффект неквантового высвобождения может быть выявлен только в условиях ингибированной холинэстеразы. В то же время одновременное высвобождение 7 000 молекул АХ в одном кванте локально преодолевает активность этого фермента за счет субстратного ингибирования и позволяет АХ достичь постсинаптических рецепторов и вызвать МПКП (глава 13).

Флуктуации потенциала концевой пластинки

Типичный синаптический потенциал в скелетном нервно-мышечном соединении деполяризует постсинаптическую мембрану на 50–70 мВ. Какой механизм высвобождения АХ — утечка или кванты — лежит в основе этого синаптического потенциала? Фетт и Катц обнаружили, что при уменьшении синаптической передачи путем понижения экстраклеточной концентрации кальция и увеличения концентрации магния постсинаптические ответы, вызываемые стимуляцией нервов, флуктуируют ступенчатым образом, как показано на рис. 11.8А[23]. Некоторые стимулы не вызывают ответов вовсе, некоторые вызывают ответы с амплитудой около 1 мВ, идентичные по размеру и форме спонтанным миниатюрным потенциалам; наконец, остальные вызванные ответы имеют двух-, трех- или четырехкратную амплитуду по отношению к амплитуде миниатюрных спонтанных потенциалов.

Это удивительное наблюдение привело к **квантовой гипотезе**, в которой предполагается, что одиночные квантовые события, возникающие спонтанным образом, представляют собой также «строительные блоки» для синаптических потенциалов, вызванных стимуляцией. В физиологических условиях потенциалы концевой пластинки состоят примерно из 200 квантовых единиц, и вариации в их амплитуде незначительны. В условиях пониженной концентрации кальция размер кванта остается неизменным, однако квантовый состав очень мал — около 1, 2 или 3 квантов — и случайным образом флуктуирует от одного события к другому, приводя к ступенеобразным флуктуациям в амплитуде потенциала концевой пластинки.

Статистический анализ потенциалов концевой пластинки

Кастильо и Катц решили применить статистический анализ для проверки квантовой

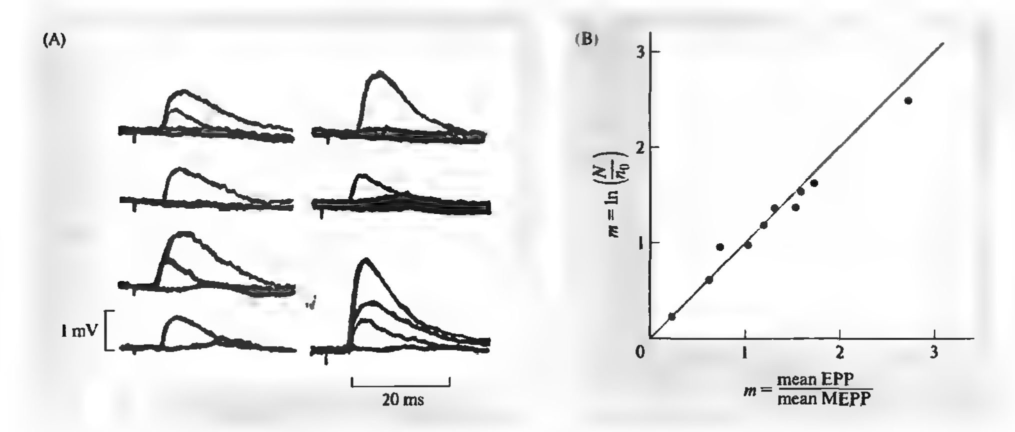


Рис. 11.8. Потенциалы концевой пластинки состоят из квантовых единиц, которые соответствуют спонтанным миниатюрным потенциалам. Пресинаптическое высвобождение АХ в нервно-мышечном окончании лягушки было уменьшено за счет снижения концентрации кальция в наружном растворе. (А) Примеры ответов, вызываемых стимуляцией нерва и регистрируемых внутриклеточно от мышечного волокна. Амплитуда потенциалов концевой пластинки (ПКП) варьирует ступенчатым образом; самые маленькие ответы по амплитуде соответствуют спонтанным миниатюрным потенциалам (МПКП). (В) Сравнение среднего квантового состава (m) ПКП, определенного двумя способами: применением распределения Пуассона, $m = \ln(N/n_0)$, и путем деления средней амплитуды ПКП на среднюю амплитуду МПКП. Великолепное соответствие этих двух оценок подтверждает гипотезу о том, что ПКП состоят из квантовых единиц, соответствующих спонтанным МПКП.

Fig. 11.8. The End-Plate Potential Is Composed of Quantal Units That Correspond to Spontaneous Miniature Potentials. Presynaptic release of ACh at a frog neuromuscular junction was reduced by lowering the calcium concentration in the bathing solution. (A) Sets of intracellular records, each showing two to four superimposed responses to nerve stimulation. The amplitude of the end-plate potential (EPP) varies in a stepwise fashion; the smallest response corresponds in amplitude to a spontaneous miniature potential (MEPP). (B) Comparison of the mean quantal content (m) of the EPP determined in two ways: by applying the Poisson distribution, $m = \ln(N/n_0)$, and by dividing the mean EPP amplitude by the mean MEPP amplitude. Agreement of the two estimates supports the hypothesis that the EPP is composed of quantal units that correspond to spontaneous MEPPs. (A after Fatt and Katz, 1952; B after del Castillo and Katz, 1954.)

гипотезы[31)]. Они предположили, что двигательное нервное окончание содержит тысячи квантовых пакетов АХ (n), каждый из которых имеет вероятность (p) быть высвобожденным в ответ на нервный импульс, а также что кванты высвобождаются независимо, т. е. высвобождение одного не влияет на вероятность высвобождения последующего. При большом количестве событий среднее количество квантов (m), высвобождаемых во время события, будет равным np, а количество событий, состоящих из $0, 1, 2, 3, 4, \ldots$ или x квантов, должно соответствовать **биноминальному распределению**. Однако Кастильо и Катц не имели возможности измерить n или p экспериментально, и поэтому они не могли использовать биномиальное распределение для проверки гипотезы о том, что потенциал концевой пластинки состоит из единиц одинакового размера, соответствующих спонтанным миниатюрным потенциалам. Для того, чтобы справиться с этой проблемой, они рассуждали следующим образом:

В нормальных условиях можно предположить, что p сравнительно велика, т. е. большая часть синаптической популяции отвечает на импульс. Однако как только мы уменьшаем концентрацию кальция и увеличиваем концентрацию магния, вероятность ответа уменьшается, и мы не наблюдаем ответов на большую часть стимулов, и редко — ответы, состоящие из одной или двух единиц. В этих условиях, когда p очень мала, количество единиц x, которые составляют ПКП, при большом количестве наблюдений должно распределяться по закону Пуассона.

Распределение Пуассона является приближением к биномиальному распределению в случаях малых значений p. Принципиальным отличием является то, что для предсказания Пуассоновского распределения не обязатель-

но знать n или p. Экспериментатору необходимо измерить лишь их общий продукт m, среднее количество квантов, высвобождаемых во время одного события. Предполагаемое количество ответов, состоящих из x квантов, задается в распределении Пуассона по формуле:

$$n_x = N\left(\frac{m^x}{x!}\right)e^{-m}.$$

Одним из лучших примеров использования распределения Пуассона в истории был анализ числа прусских кавалерийских офицеров, убиваемых за год ударом лошадиного копыта. При большом количестве офицеров (n) вероятность (p) того, что кто-то из них будет убит, очень мала. В некоторые годы никто из офицеров не погибал; в остальные погибали один, а иногда и двое. В течение длительного периода наблюдений количество лет, в которые погибали 0, 1, 2 или 3 офицера, приближались к значениям из уравнения Пуассона, при использовании только средних значений «удачных» пиков в год (m) для определения теоретически предполагаемого распределения.

Другим примером, в котором уравнение Пуассона может предсказать распределение событий, является игровой автомат типа «однорукий бандит». Размер одной единицы равен 5 центам, автомат содержит большое количество монет, а вероятность выпадения каждой монеты очень мала и не зависит от других монет. Если известно среднее количество монет, выплачиваемых за игру, то при длительном наблюдении за игрой уравнение Пуассона точно предскажет, сколько раз игра будет проиграна, а также сколько раз игрок получит одну, две и более монет. И вновь важным свойством уравнения Пуассона является то, что свойство распределения зависит только от m.

Следовательно, для того чтобы проверить, подчиняются ли флуктуации потенциалов концевой пластинки при сниженной концентрации кальция закону Пуассона, необходимым является лишь значение m, среднее количество единиц, высвобождаемых за одно событие. Это значение получается путем деления средней амплитуды вызванных потенциалов на размер единицы — среднюю амплитуду спонтанных миниатюрных потенциалов:

$$m = \frac{\text{средняя амплитуда вызванных потенциалов}}{\text{средняя амплитуда миниатюрного потенциала}}.$$

В случае игрового автомата m равняется среднему количеству денег, выплачиваемому по результатам каждой игры (по всей видимости, не очень много, скажем, 1,5 цента за игру), деленному на размер единицы (5 центов), что дает $m = 0{,}3$ единицы за игру. Если амплитуды потенциалов концевой пластинки распределяются в соответствии с уравнением Пуассона, то m также может быть определено по количеству нулевых ответов n_0. В уравнении Пуассона при $x = 0$ $n_0 = Ne^{-m}$ (поскольку m^0 и $0! = 1$). Таким образом, формула может быть упрощена до:

$$m = \ln\left(\frac{N}{n_0}\right).$$

Кастильо и Катц провели регистрацию большого количества потенциалов концевой пластинки, вызванных стимуляцией нерва, в условиях пониженного кальция и повышенного магния в наружном растворе, а также большого количества спонтанных миниатюрных потенциалов. Рассчитав m этими двумя способами, они обнаружили практически полное совпадение результатов, что послужило серьезным доказательством в пользу квантовой гипотезы (рис. 11.8B).

С целью дальнейшей проверки квантовой гипотезы можно попытаться предсказать полное распределение амплитуд ответов, используя значение m и средней амплитуды миниатюрного потенциала (рис. 11.9). Как и ранее, m рассчитывается как соотношение между средним вызванным потенциалом и средним спонтанным миниатюрным потенциалом. Затем рассчитывается количество предполагаемых ответов, состоящих из $0, 1, 2, 3, \ldots$ квантов. Для принятия в расчет небольшой вариации в амплитуде кванта предполагаемое количество ответов, содержащих один квант, распределяется от среднего размера кванта с тем же разбросом, как и у спонтанных событий (рис. 11.9, вставка). Предполагаемое количество ответов, состоящих из 2, 3 и более квантов, распределяется вокруг средних значений с пропорционально увеличивающимся разбросом. Отдельные распределения затем суммируются для получения теоретического распределения, показанного на рисунке сплошной линией. Согласие с экспериментально полученным распределением (столбики) обеспечивает дополнительное доказательство квантовой гипотезы.

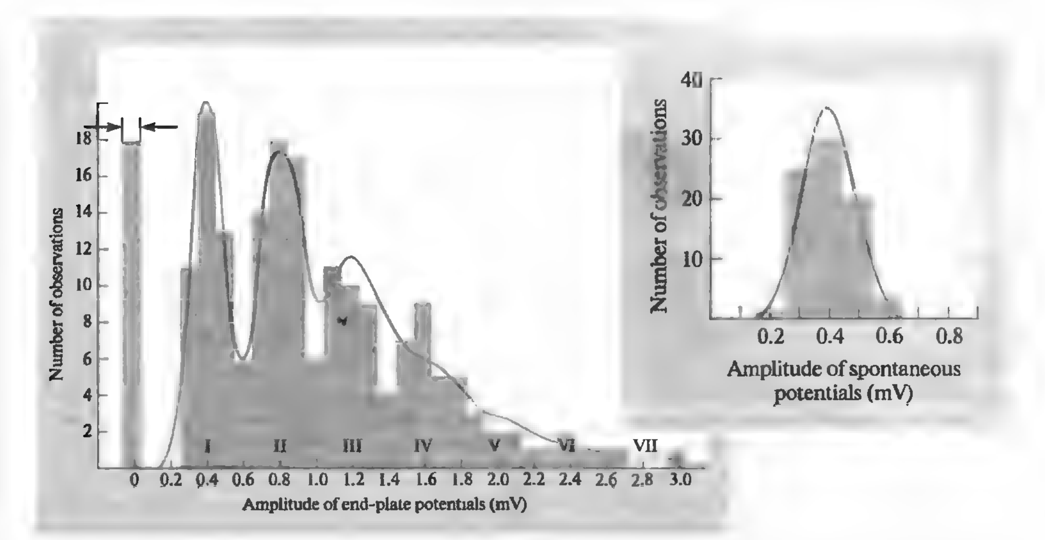


Рис. 11.9. Распределение амплитуд потенциалов концевой пластинки в нервно-мышечном соединении млекопитающего в условиях повышенной (12,5 ммоль) внеклеточной концентрации ионов магния. На гистограмме показано количество событий с амплитудой, указанной по оси абсцисс. Максимальное количество событий имеет амплитуду 0 мВ (т. е. медиатор не выделяется вовсе); другие пики гистограммы соответствуют 1-, 2-, 3- и 4-кратной амплитуде спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (см. вставку), указывая на то, что ответы состоят из 1, 2, 3 и 4 квантов. Сплошная линия соответствует теоретическому распределению амплитуд потенциалов концевой пластинки, рассчитанному по уравнению Пуассона с поправкой на разброс амплитуды размера кванта. Стрелками указано предсказанное уравнением Пуассона количество нулевых событий.

Fig. 11.9. Amplitude Distribution of end-plate potentials at a mammalian neuromuscular junction in high (12,5 m*M*) magnesium solution. The histogram shows the number of end-plate potentials observed at each amplitude. The peaks of the histogram occur at 0 mV (failures) and at one, two, three, and four times the mean amplitude of the spontaneous miniature end-plate potentials (inset), indicating responses comprising 1, 2, 3, and 4 quanta. The solid line represents the theoretical distribution of end-plate potential amplitudes calculated according to the Poisson equation and allowing for the spread in amplitude of the quantal size. The arrows indicate the predicted number of failures. (From Boyd and Martin, 1956.)

Во многих синапсах вероятность высвобождения довольно высока, и распределение Пуассона неприложимо. В этих условиях необходимо использовать собственно биномиальное распределение. В биномиальном распределении количество единиц, способных участвовать в ответе, может быть больше или меньше, так же как и вероятность высвобождения. Необходимым остается условие того, что кванты высвобождаются независимо друг от друга. Как и ранее, если мы возьмем среднее квантовое высвобождение (m) как результат количества единиц, способных к участию в ответе n и среднюю вероятность высвобождения (p), то встречаемость множественных событий в соответствии с биномиальным распределением равна:

$$n_x = N\left(\frac{n!}{(n-x)!x!}\right)p^x q^{n-x},$$

где n_x является количеством ответов, состоящих из x квантов, N — общее количество событий и $q = 1 - p$.

Соответствие процесса высвобождения биномиальной статистике было впервые показано на нервно-мышечном соединении рака[32)].

Таким образом, на сегодняшний день имеются веские доказательства в пользу того, что медиатор высвобождается в виде пакетов, или квантов[33, 34)]. Точное определение размера кванта и квантового состава важны для определения места действия различных факторов и веществ, которые модулируют синаптическую передачу (главы 10, 12, 16). В целом, пресинаптические модуляторные эффекты изменяют количество высвобождаемого медиатора, меняя квантовый состав, но не влияя на размер кванта. С другой стороны, модуляция на постсинаптическом уровне влияет на чувствительность постси-

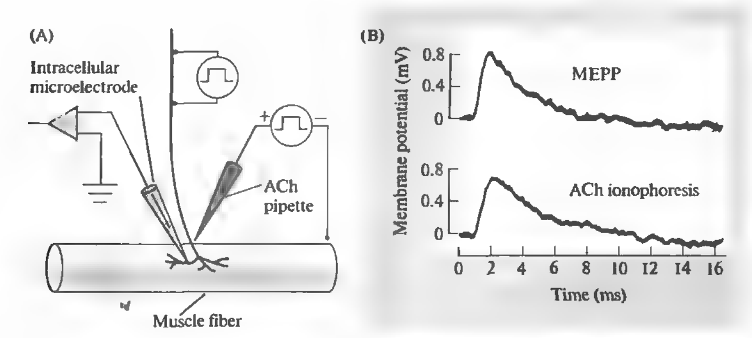


Рис. 11.10. Количество молекул АХ в одном кванте, определенное ионофоретической аппликацией АХ. (А) Внутриклеточный микроэлектрод регистрирует спонтанные миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и ответы на ионофоретическую аппликацию АХ. (В) МПКП практически полностью воспроизводится ионофоретическим толчком АХ. Время роста ответа, вызванного ионофорезом АХ, чуть медленнее, так как пипетка с АХ находится дальше от постсинаптической мембраны, чем нервное окончание.

Fig. 11.10. The Number of ACh Molecules in a Quantum is determined by. mimicking a spontaneous miniature end-plate potential with an ionophoretic pulse of ACh. (A) An intracellular microelectrode records spontaneous miniature end-plate potentials (MEPPs) and the response to ionophoretic application of ACh. (B) A MEPP is mimicked almost exactly by an ionophoretic pulse of ACh. The rate of rise of the ionophoretic ACh pulse is slightly slower because the ACh pipette is further from the postsynaptic membrane than is the nerve terminal. (B after Kuffler and Yoshikami, 1975a.)

наптической клетки к медиатору и изменяет квантовый размер, не влияя на количество высвобождаемых квантов. При низкой вероятности высвобождения (p), как и в случае низкой концентрации кальция, распределение Пуассона является удобным способом для анализа флуктуаций. Для описания распределения ответов при высокой вероятности высвобождения становится необходимой биномиальная статистика. В дополнение к этому, биномиальная статистика может обеспечить информацией о том, является ли изменение количества высвобождаемого медиатора следствием изменения количества доступных квантов или вероятности их высвобождения.

Квантовый состав в синапсах между нейронами

Одним из удивительных свойств нервной системы позвоночных является уменьшение среднего квантового состава при переходе от нервно-мышечного соединения, которое характеризуется очень малым уровнем интеграции ($m = 200–300$), к вегетативным ганглиям ($m = 2–20$)[35, 36] и, наконец, к синапсам центральной нервной системы (в которых m может быть равно 1)[37, 38], в которой постсинаптические клетки могут интегрировать входы от десятков тысяч пресинаптических клеток. Например, в синапсе между первичным афферентным волокном мышечного веретена и мотонейроном спинного мозга средний квантовый состав примерно равен 1[39]. Это, однако, не означает, что передача в этих синапсах ненадежна, как это могло бы следовать из распределения Пуассона. Высвобождение в этих синапсах скорее соответствует биномиальной статистике с высокой вероятностью ($p \sim 0,9$) и малым числом доступных квантов ($n \sim 1$). В большинстве синапсов в ЦНС квантовое высвобождение является основным механизмом синаптической передачи. Однако во многих случаях бывает трудно применить простой Пуассоновский или биномиальный статистический анализ. Сложность и разнообразие синаптических контактов в ЦНС послужило основанием для развития более сложных статистических методов обработки данных[38, 40, 41].

Количество молекул в кванте

Хотя из экспериментов Катца, Фетта и Кастильо было очевидным, что один квант в нервно-мышечном соединении содержит более одной молекулы АХ, истинное количество молекул в одном кванте оставалось неизвестным. Куффлер и Йошиками первыми получили такого рода оценку, используя очень тонкие пипетки для ионофореза АХ на постсинаптическую мембрану мышцы змеи[24]. Ответ,

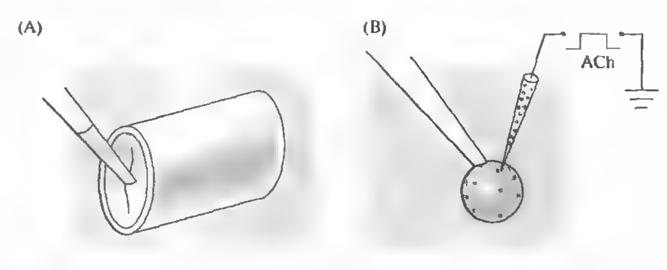


Рис. 11.11. Количественный анализ АХ, выделяемого из микропипетки при ионофорезе. (А) Капелька жидкости, покрытая масляной пленкой, забирается из капилляра. (В) АХ инъецируется в эту капельку серией ионофоретических пульсов, которые использовались для воспроизведения спонтанных миниатюрных потенциалов (см. рис. 11.10B). (С) После измерения объема заполненная АХ капелька касается поверхности между маслом и раствором Рингера в области концевой пластинки мышцы змеи и высвобождает свое содержимое в водную фазу. Деполяризация концевой пластинки, вызываемая этой капелькой, сравнивается с деполяризацией, вызванной капельками с известной концентрацией АХ. Когда концентрация АХ в тестовой капельке определена, можно рассчитать количество АХ, высвобождаемого при одном ионофоретическом пульсе.

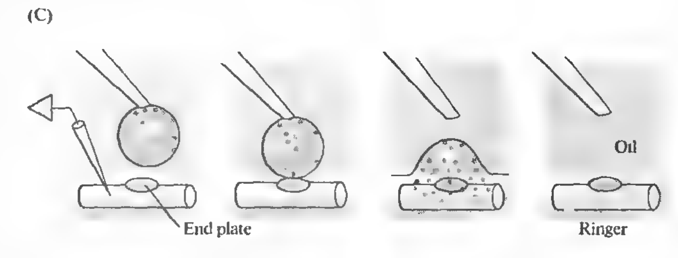


Fig. 11.11. Assay of ACh Ejected from a Micropipette by ionophoresis. (A) A droplet of fluid is removed from the dispensing capillary under oil. (B) ACh is injected into the droplet by a series of ionophoretic pulses, each identical to that used to mimic a spontaneous miniature potential (see Figure 11.10B). (C) After its volume is measured, the ACh-loaded droplet is touched against the oil-Ringer interface at the end plate of a snake muscle, discharging its contents into the aqueous phase. The depolarization of the end plate is measured (not shown) and compared with that produced by droplets with known ACh concentration. Once the concentration in the test droplet is determined, the amount of ACh released per pulse from the electrode can be calculated. (After Kuffler and Yoshikami, 1975b.)

вызываемый коротким пульсом АХ, практически полностью совпадал со спонтанными миниатюрными потенциалами (рис. 11.10). Для измерения количества молекул, выделяемых из пипетки, АХ выделялся повторными пульсами в капельку раствора (около 0,5 мкл), находящегося под слоем масла (рис. 11.11). Эта капелька затем наносилась на концевую пластинку мышечного волокна змеи и измерялась результирующая деполяризация. Ответ сравнивался с ответами на капельки точно такого же размера, содержащие известные концентрации АХ. Таким образом были определены концентрации АХ в тестирующей капельке и количество молекул АХ, высвобождаемых каждым пульсом. Пульс АХ, воспроизводящий спонтанный миниатюрный потенциал, содержал примерно 7 000 молекул

Количество каналов, активируемых квантом

Если квант АХ состоит из 7 000 молекул, то можно ожидать, что лишь несколько тысяч свяжутся с постсинаптическими рецепторами в нервно-мышечном соединении, а остальные будут потеряны в результате диффузии из синаптической щели или гидролиза холинэстеразой. Количество рецепторов, активируемых одним квантом, может быть определено путем сравнения проводимости, активируемой во время миниатюрного потенциала с проводимостью одиночного ионного канала, активируемого АХ[42]. Регистрация миниатюрных токов концевой пластинки в условиях фиксации потенциала в мышце лягушки выявила, что проводимость, активируемая на пике ответа, составляет около 40 нС. Одиночный АХ рецептор имеет проводимость около 30 пС. Следовательно, миниатюрный потенциал концевой пластинки является результатом открывания около 1 300 каналов. (Это соответствует 2 600 молекул АХ, поскольку для открывания канала требуется две молекулы АХ; см. главы 9, 13.) Схожие результаты были получены Катцем и Миледи, которые оценили вклад одиночных каналов в потенциал концевой пластинки на основании анализа шума[43]. Близкое значение количества каналов, открываемых квантом медиатора, было получено в глицинэргических тормозных синапсах продолговатого мозга миноги[44]. В других синапсах были

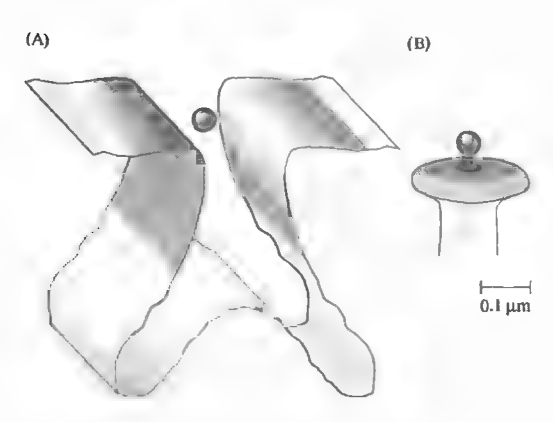


Рис. 11.12. Соотношение площади постсинаптической мембраны и размера синаптической везикулы. (А) В нервно-мышечном соединении лягушки рецепторы АХ плотно упакованы (~ 10 000/мкм^2) на значительной площади постсинаптической мембраны (затененные области). Поэтому количество рецепторов превышает количество молекул АХ, и размер квантового события варьирует в зависимости от количества молекул в кванте. (В) В типичном гиппокампальном синапсе постсинаптические рецепторы упакованы значительно реже (~ 2 800/мкм^2) и на гораздо меньшей площади (0,04 мкм^2). В результате количество молекул медиатора в кванте достаточно для того, чтобы насытить все доступные рецепторы, и квантовые события имеют очень маленькие флуктуации по амплитуде.

Fig. 11.12. The Area of Postsynaptic Membrane Relative to the Size of a Synaptic Vesicle. (A) At the frog neuromuscular junction ACh receptors are packed at high density (~ 10 000/μm^2) over a large postsynaptic area (shaded). Accordingly, receptors outnumber ACh molecules, and the size of the quantal event varies with the variation in the number of molecules per quantum. (B) At a typical hippocampal synapse, postsynaptic receptors are packed less densely (~ 2 800/μm^2) over a very small area (0,04 μm^2). As a result, the number of transmitter molecules in a quantum is sufficient to saturate the available receptors, and quantal events show very little fluctuation in amplitude.

получены меньшие значения. Например, в синапсах на гиппокампальных нейронах квантовый ответ соответствует открыванию от 15 до 65 каналов[38, 45].

Почему между синапсами существуют такие различия? Очевидно, что количество постсинаптических рецепторов, активируемых квантом медиатора, высвобождаемого из одного пресинаптического бутона, должно соответствовать размерам клетки. В больших клетках с низким входным сопротивлением, как, например, скелетные мышечные волокна или мюллеровские клетки миноги, значительный эффект одного кванта будет наблюдаться при активации большого количества рецепторов. Активация такого же количества рецепторов в очень маленькой клетке приведет к перенасыщению и шунтированию всех других проводимостей и деполяризации клетки к потенциалу около 0, если синапс является возбуждающим, или же к фиксированию мембранного потенциала на уровне равновесного потенциала ионов хлора, если синапс является тормозным.

Каким образом достигается соответствие между размером клетки и количеством рецепторов, активируемых квантом медиатора? Уменьшается ли при этом количество молекул в кванте, или же снижается количество постсинаптических рецепторов? Точное значение количества молекул медиатора в синаптических везикулах в ЦНС пока неизвестно. Количество молекул медиатора в глутамат-содержащих везикулах было оценено в 4 000[46], т. е. того же порядка, что и количество молекул АХ в везикулах в нервно-мышечном соединении. С другой стороны, анализ квантовых флуктуаций в возбуждающих и тормозных синапсах на гиппокампальных клетках предполагает, что количество доступных постсинаптических рецепторов намного меньше, чем в нервно-мышечном соединении[38, 45]. Квантовые события в гиппокампальных синапсах активируют лишь около 15–65 каналов. Амплитуда этих квантовых событий имеет очень малый разброс, что указывает на то, что количество молекул, высвобожденных одним квантом, всегда более чем достаточно для активации всех доступных рецепторов. В противоположность этому, увеличение количества молекул медиатора в кванте в нервно-мышечном соединении приводит к увеличению квантовых событий[47, 48]. Различие в количестве доступных постсинаптических рецепторов, рассчитанном по квантовым флуктуациям, согласуется с различием в морфологии синапсов (рис. 11.12): в нервно-мышечном соединении рецепторы плотно упакованы (около 10 000/мкм^2) на больших площадях постсинаптической мембраны, обеспечивая практически безграничное количество рецепторов для каждого кванта медиатора (глава 13). В типичном синапсе гиппокампа плотность постсинаптических рецепторов

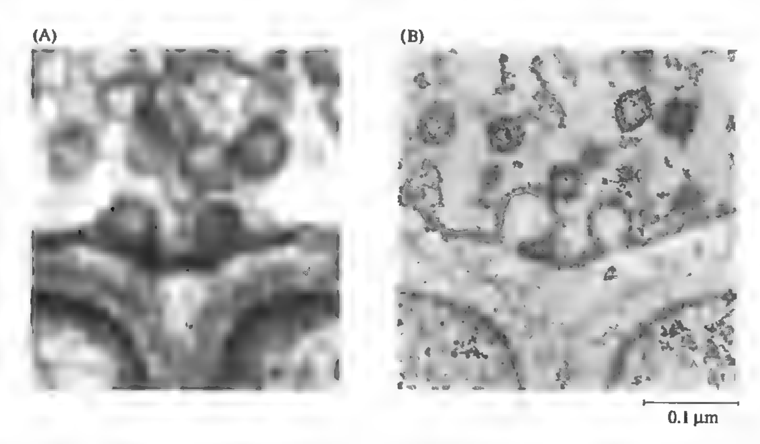


Рис. 11.13. Высвобождение нейромедиатора посредством экзоцитоза синаптических везикул. Электронные микрофотографии нервно-мышечного соединения. (А) Кластер синаптических везикул, расположенных в пресинаптическом окончании, контактирует с электронно-плотным участком пресинаптической мембраны, формируя активную зону. (В) Одиночный стимул был нанесен на двигательный нерв в присутствии 4-аминопиридина — вещества, которое значительно увеличивает высвобождение медиатора, продляя потенциал действия, — и ткань была заморожена в течение нескольких миллисекунд после стимула. Везикулы, которые находились около активной зоны, слились с пресинаптической мембраной и освободили свое содержимое в синаптическую щель путем экзоцитоза.

Fig. 11.13. Release of Neurotransmitter by Synaptic Vesicle Exocytosis. High-power electron micrographs of frog neuromuscular junctions. (A) A cluster of synaptic vesicles within the presynaptic terminal contacts an electron-dense region of the presynaptic membrane, forming an active zone. (B) A single stimulus was applied to the motor nerve in the presence of 4-aminopyridine, a drug that greatly increases transmitter release by prolonging the action potential, and the tissue was frozen within milliseconds. Vesicles docked at the active zone have fused with the presynaptic membrane and released their contents into the synaptic cleft by exocytosis. (A, micrograph kindly provided by U. J. McMahan; B from Heuser, 1977.)

ниже (около 2800/мкм^2)[49], и площадь, занимаемая постсинаптической мембраной, очень мала (0,04 мкм^2)[50]; таким образом, на ней присутствует менее 100 постсинаптических рецепторов.

Изменение размера кванта в нервно-мышечном соединении

Хотя величина спонтанных миниатюрных потенциалов в каждом синапсе является практически постоянной величиной, в определенных условиях могут иметь место исключения из этого правила. Например, во время развития и регенерации двигательных нервных окончаний амплитуды спонтанных миниатюрных потенциалов имеют не нормальное, а скошенное распределение, уходящее в шум базовой линии; т. е. большое количество спонтанных потенциалов имеет очень маленькую амплитуду[51, 52]. С другой стороны, иногда наблюдаются спонтанные синаптические потенциалы, значительно превышающие обычные миниатюрные потенциалы[53]. В определенных условиях эти большие потенциалы связаны со спонтанным высвобождением одновременно двух или более квантов; в других случаях их размер не соотносится столь явным образом с размером нормальных квантов. Наконец, в ряде некоторых нервно-мышечных заболеваний, например, в случае злокачественной миастении, спонтанные миниатюрные и вызванные синаптические потенциалы уменьшаются в амплитуде вследствие уменьшения количества рецепторов на постсинаптической мембране[54].

§ 3. Везикулярная гипотеза высвобождения медиатора

Вскоре после того, как с помощью электрофизиологических методов было показано, что высвобождение медиатора имеет квантовый характер, электронная микроскопия нервно-мышечного соединения позволила выявить большое количество маленьких, связанных с мембраной синаптических везикул внутри аксонных терминалей (рис. 11.13А)[55, 56].

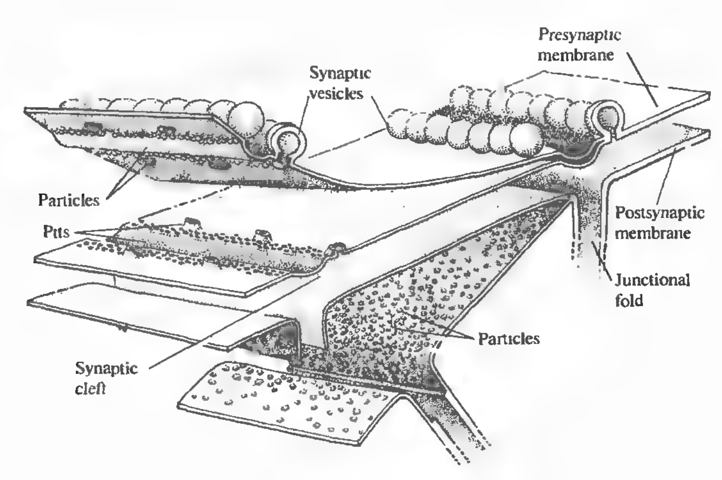


Рис. 11.14. Структура синаптической мембраны в нервно-мышечном соединении лягушки. Объемное изображение пресинаптической и постсинаптической мембран; каждая мембрана разделена на две части — цитоплазматическую и наружную, как это происходит при замораживании-скалывании. Цитоплазматическая половина пресинаптической мембраны в области активной зоны обнаруживает на своей поверхности скола выступающие частицы, и соответствующие им углубления видны на сколе наружного листка мембраны. Постсинаптическая мембрана, расколотая в области складок, обнаруживает большое количество частиц на цитоплазматическом листке; эти частицы являются рецепторами АХ.

Fig. 11.14. Synaptic Membrane Structure at the frog neuromuscular junction. Three-dimensional view of presynaptic and postsynaptic membranes, with each membrane split along its intramembranous plane as might occur in freeze-fracture. The cytoplasmic half of the presynaptic membrane at the active zone shows on its fracture face protruding particles whose counterparts are seen as pits on the fracture face of the outer membrane leaflet. Vesicles fusing with the presynaptic membrane give rise to pores and protrusions on the two fracture faces. The fractured postsynaptic membrane in the region of the folds shows a high concentration of particles on the fracture face of the cytoplasmic leaflet; these are ACh receptors. (Kindly provided by U. J. McMahan.)

Это наблюдение легло в основу **везикулярной гипотезы** высвобождения медиатора, которая предполагает, что квант медиатора соответствует содержимому одной везикулы и что высвобождение происходит посредством экзоцитоза, при котором везикула сливается с пресинаптической мембраной и высвобождает свое содержимое в синаптическую щель (рис. 11.13В).

Ультраструктура нервного окончания

В результате морфологических исследований были получены доказательства в пользу везикулярной гипотезы высвобождения. Первые исследования такого рода были проведены на нервно-мышечном соединении. Последующие эксперименты показали, что основные морфологические свойства химических синапсов схожи во всей нервной системе, то есть в химических синапсах высвобождение осуществляется путем экзоцитоза везикул, которые содержат медиатор. Небольшой участок нервно-мышечного соединения лягушки схематически изображен на рис. 11.14, как если бы пре- и постсинаптическая мембраны были разделены с помощью методики замораживания-скалывания на цитоплазматическую и внешнюю части.

Верхняя часть рис. 11.14 изображает пресинаптическую мембрану с везикулами, которые выстраиваются с цитоплазматической стороны. Некоторые из везикул находятся в процессе экзоцитоза. Наружная поверхность цитоплазматической половины пресинаптической мембраны содержит внутримембранные частицы, выступающие с поверхности скола; соответствующие им углубления можно увидеть на сколе внешней части пресинаптической мембраны. Схожие частицы и углубления находятся также на сколах постсинаптической мембраны. В дополнении к этому на пресинаптической мембране видны экзоцитирующие везикулы в виде углублений на внешней стороне цитоплазматической части мембраны и как сколотые наросты на внутренней стороне внешней ее части.

Рис. 11.15. Структура нервно-мышечного соединения лягушки. (А) Срез через нервное окончание, параллельный активной зоне, с везикулами, выстроившимися вдоль нее в два ряда. Получено с помощью электронного трансмиссионного микроскопа. (В) Скол цитоплазматической половины пресинаптической мембраны в области активной зоны. Активная зона имеет вид полоски, по границам которой располагаются частицы с диаметром около 10 нм; латеральнее располагаются небольшие кратеры, которые соответствуют местам слияния синаптических везикул с мембраной. (С) Скол синаптической области при малом увеличении. Скол вначале проходит через мембрану пресинаптического окончания (Т), обнаруживая наружный листок со стороны скола, затем пересекает синаптическую щель (С) и входит в постсинаптическую мембрану. На сколе между складками (F) можно увидеть агрегаты АХ рецепторов на цитоплазматическом листке. Можно также увидеть отростки шванновской клетки (S), которые проходят между нервным окончанием и мышцей.

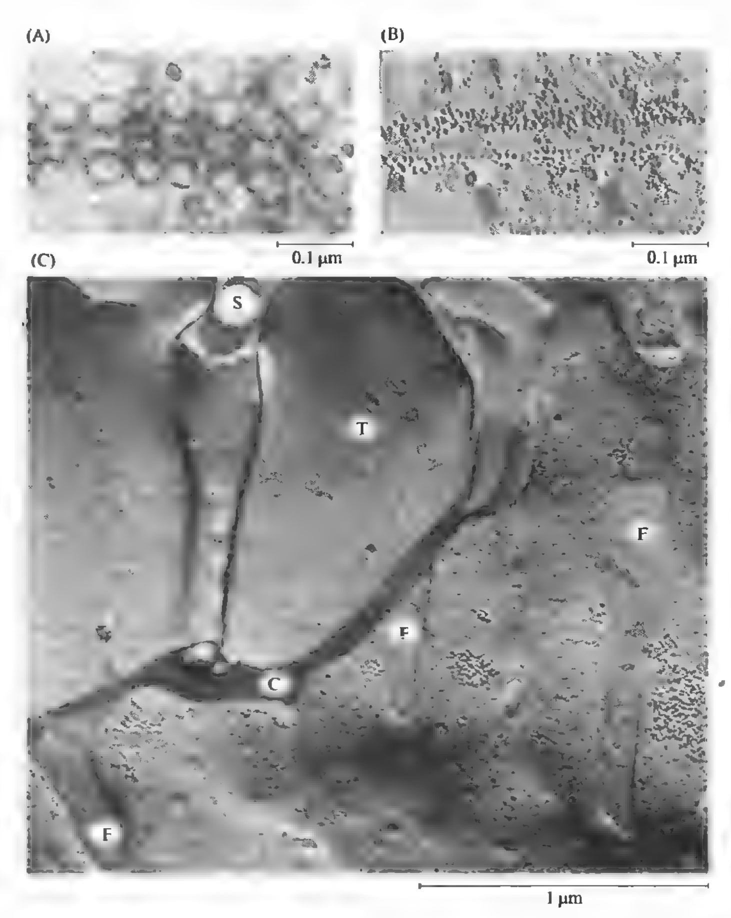


Fig. 11.15. Structure of the Frog Neuromuscular Junction. (A) Transmission electron micrograph of a section through the nerve terminal parallel to an active zone, showing two lines of vesicles. (B) Fracture face of the cytoplasmic half of the presynaptic membrane in an active zone. The active zone region is delineated by particles about 10 nm in diameter and flanked by pores caused by fusion of synaptic vesicles with the membrane. (C) Low-power view of fractured synaptic region. The fracture passes first through the presynaptic terminal membrane (T), showing the fracture face of the outer leaflet, then crosses the synaptic cleft (C) to enter the postsynaptic membrane. On the fracture face between the folds (F) one sees on the cytoplasmic leaflet aggregates of ACh receptors. A Schwann cell process (S) passes between the nerve terminal and the muscle. (A from Couteaux and Pecot-Déchavassine, 1970; B and C from Heuser, Reese, and Landis, 1974.)

Электронная микрофотография горизонтального среза активной зоны показана на рис. 11.15А, вид со стороны цитоплазмы нервного окончания. Упорядоченный ряд синаптических везикул выстроен с двух сторон полосы электронно-плотного материала. На рис. 11.15В показано, как выглядит соответствующий скол цитоплазматической части пресинаптической мембраны, что равносильно рассмотрению этого же участка со стороны синаптической щели. Ряды частиц, имеющих диаметр около 10 нм, примыкают к активной зоне с обеих сторон. Латеральнее находятся углубления, которые соответствуют местам открывания экзоцитирующих везикул. Описанные ранее электрофизиологические эксперименты, в которых буферы ионов кальция инъецировались в пресинаптические окончания, указывают на близкую связь между кальциевыми каналами и местами высвобождения. Поэтому по крайней мере некоторые из мелких частиц, располагающихся непосред-

ственно вдоль полос (рис. 11.15B), могут соответствовать потенциал-активируемым кальциевым каналам, запускающим экзоцитоз.

Результаты исследований, полученные на нервно-мышечном соединении лягушки и мыши с использованием различных токсинов, подтверждают данную гипотезу[57)–59)]. ω-конотоксин, который необратимо блокирует нервно-мышечную передачу, связываясь с пресинаптическими кальциевыми каналами[60)], был соединен с флуоресцентной молекулой. При микроскопическом исследовании было обнаружено, что флюоресценция сконцентрирована в виде узких пучков, разделяемых интервалами около 1 мкм, что соответствует расстоянию между активными зонами (рис. 11.16). Одновременная окраска постсинаптических АХ рецепторов с помощью флуоресцентного α-бунгаротоксина выявила соответствие в пространственном расположении пресинаптических кальциевых каналов и постсинаптических складок, которые имеют наибольшую плотность АХ-рецепторов.

На рис. 11.15C изображен участок нервно-мышечного соединения лягушки, полученный с использованием техники замораживания-скалывания. На верхней левой его части скалывание обнажило наружную часть пресинаптической мембраны. Затем скол проходит через синаптическую щель и обнажает цитоплазматическую часть постсинаптической мембраны. Вдоль обоих сторон постсинаптических складок располагаются кластеры частиц, которые, по всей видимости, являются АХ-рецепторами, сконцентрированными в этой области концевой пластинки (глава 9)[61)–63)].

Экзоцитоз синаптических везикул

Основным из положений везикулярной гипотезы высвобождения яаляется то, что при стимуляции все растворимое содержимое синаптических везикул должно высвобождаться в синаптическую щель. Проверка этого положения была впервые осуществлена не на нейронах, а на клетках мозгового вещества надпочечников, которые выделяют хромаффинные гранулы[64)]. Хромаффинные гранулы — это органеллы, аналогичные синаптическим везикулам, но имеющие гораздо больший размер; они содержат адреналин, норадреналин, АТФ, фермент синтеза дофамин-β-гидролазу, а также белки, которые называются хромогранинами. Все эти компоненты высвобождаются при стимуляции мозгового вещества надпочечников, и в наружном растворе они оказываются точно в таком же соотношении, как и внутри очищенных гранул.

Высвобождаемое из нейронов вещество также хорошо соответствует содержимому везикул, хотя выделение и очистка синаптических везикул из нервных окончаний с целью изучения их содержимого является весьма сложной задачей. Например, маленькие синаптические везикулы в нейронах симпатической нервной системы содержат норадреналин и АТФ; большие электронно-плотные везикулы содержат также дофамин, β-гидроксилазу и хромогранин А. Стимуляция симпатических аксонов приводит к высвобождению всех этих везикулярных компонентов[65)]. Везикулы, выделенные из холинэргических нейронов, содержат АХ и АТФ, и оба эти вещества выделяются при стимуляции холинэргических нервов[66)].

В холинэргических нейронах было также проведено количественное исследование того, соответствует ли содержимое одной синаптической везикулы одному кванту медиатора. Синаптические везикулы, выделенные из окончаний холинэргических нейронов электрического органа морского ската *Narcine brasiliensis* (родственник *Torpedo californica*) содержат около 47 000 молекул АХ[67)]. Если бы синаптические везикулы в нервно-мышечном соединении лягушки имели бы такую же внутривезикулярную концентрацию АХ, то с поправкой на их меньший размер они должны были бы содержать 7 000 молекул АХ. Это находится в прекрасном соответствии с электрофизиологическими оценками количества молекул АХ в одном кванте[24)].

Морфологическое свидетельство в пользу экзоцитоза

Хеузер и Рииз[68)] изобрели новый методический прием, который позволил им быстро замораживать мышцу лягушки в течение нескольких миллисекунд после одиночной стимуляции двигательного нерва с последующим исследованием с помощью методики замораживания-скалывания. В результате стало возможным получить сканирующие электронные микрографии везикул, запечатленных в момент слияния с пресинаптической мембраной, а также с определенной долей точности определить временной ход процесса слияния.

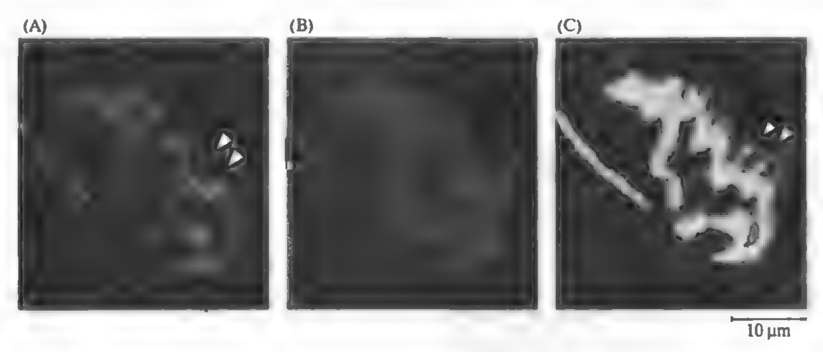


Рис. 11.16. Распределение кальциевых каналов в нервно-мышечном соединении. Нервно-мышечное соединение лягушки окрашено двумя метками: α-бунгаротоксином (В) и антителами к кальциевым каналам (А); фотографии получены с помощью конфокального лазерного микроскопа. Изображения кальциевых каналов (А), рецепторов АХ (В) и наложение этих изображений (С). Расположение кальциевых каналов совпадает с активными зонами в нервном окончании, сконцентрированными в виде узких полосок напротив постсинаптических складок, которые видны по расположению АХ рецепторов (отмечены стрелками).

Fig. 11.16. Distribution of Calcium Channels at the neuromuscular junction. Mouse neuromuscular junctions double-labeled with α-bungarotoxin (B) and with antibodies to calcium channels (A) and observed by confocal laser microscopy. Images of calcium channels (A), ACh receptors (B), and superimposed images (C). The position of the calcium channels matches that of the active zones in the nerve terminal, concentrated in narrow bands that are in register with the openings of the junctional folds, as marked by ACh receptors (arrowheads). (After Sugiura et al. 1995; micrographs courtesy of C.-P. Ko.)

С этой целью мышца крепится к нижней поверхности падающего поршня, причем двигательный нерв прикреплен к стимулирующим электродам. В процессе падения поршня запускается стимулятор, который раздражает нерв с заданным временным промежутком до того, как мышца придет в соприкосновение с медным основанием, охлажденное жидким гелием до 4 К. Важной особенностью этого эксперимента является то, что длительность пресинаптического потенциала действия продляется 4-аминопиридином (4-АП), добавляемым в наружный раствор. 4-АП значительно увеличивает количество и длительность квантового высвобождения, вызванного одиночным стимулом, и, соответственно, количество открытий везикул, которые можно увидеть с помощью электронного микроскопа (рис. 11.17А и В).

На основании этих экспериментов было сделано два важных вывода: во-первых, наибольшее количество открываемых везикул наблюдалось в том случае, если замораживание осуществлялось через 3–5 мс после стимуляции. Это соответствует пику постсинаптического тока, регистрируемого в обработанных кураре и 4-АП мышцах. Другими словами, максимальное количество открываний везикул по времени совпадало с пиком постсинаптического физиологического ответа. Во-вторых, количество открываний везикул увеличивалось при повышении концентрации 4-АП, и это увеличение было прямо пропорционально увеличивающемуся под действием 4-АП квантовому составу потенциалов концевой пластинки, который был рассчитан по данным электрофизиологических экспериментов (рис. 11.17С). Таким образом, количество открываний везикул коррелирует с количеством и временным ходом квантового высвобождения. В последующих экспериментах Хеузер и Рииз[69] дали более детальное описание временного хода открывания везикул и показали, что количество открываний увеличивается в течение периода от 3 до 6 мс после стимуляции, а затем уменьшается в течение последующих 40 мс.

Экзоцитоз был также исследован на живых клетках с помощью флуоресцентной микроскопии. В этих экспериментах пептидсодержащие везикулы были помечены флуоресцентной меткой в культивируемых клетках линии PC12, и хромаффинные гранулы — в адреномедуллярных клетках. Высвобождение катехоламинов измерялось с помощью амперометрии — метода с очень высокой чувствительностью, в котором микроэлектрод, сделанный из угольного волокна, используется для детекции медиаторов по току, возникающему при их окислении. С по-

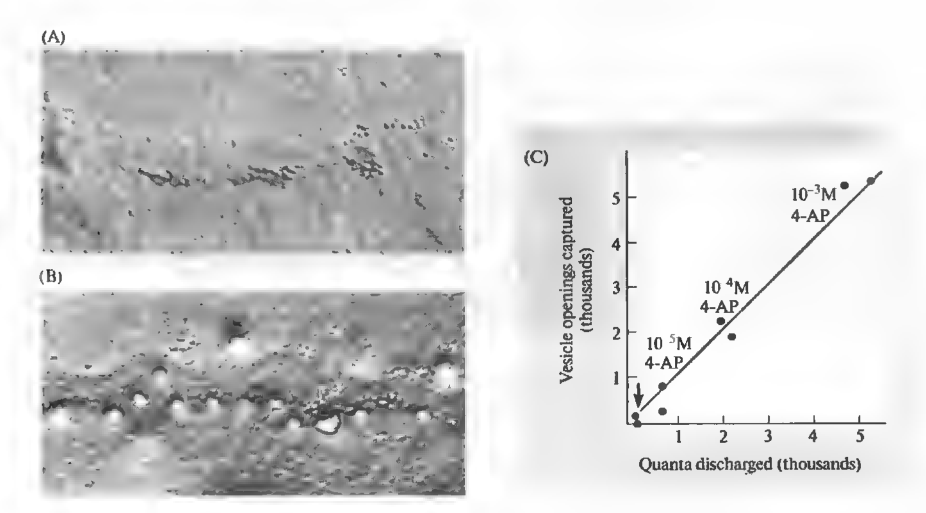


Рис. 11.17. Экзоцитоз везикул соответствует квантовому высвобождению. (A) Электронная микрофотография цитоплазматической половины пресинаптической мембраны в нервном окончании лягушки (вид со стороны синаптической щели); получено с помощью техники замораживания-скалывания. Область активной зоны имеет вид невысокого гребня, вдоль которого располагаются частицы (около 10 нм в диаметре). (B) Вид нервного окончания такой же, как на A, но полученный после заморозки в тот момент, когда нерв начал выделять большое количество квантов (5 мс после стимула). «Дыры» на мембране (одна из них отмечена квадратом) являются местами слияния везикул; широкие вмятины соответствуют везикулам, которые слились с пресинаптической мембраной после экзоцитоза (отмечены звездочками и стрелками). (C) Сравнение количества открываний везикул (подсчитанного по изображениям, полученным с помощью замораживания-скалывания) и количества высвобожденных квантов (определенного в электрофизиологическом эксперименте). Диагональная линия является теоретической зависимостью 1 : 1, которая предполагает, что одна открывшаяся везикула высвобождает 1 квант медиатора. Количество высвобождаемого медиатора изменялось путем добавления 4-АП в различных концентрациях (стрелкой обозначен контроль).

Fig. 11.17. Vesicle Exocytosis Corresponds to Quantal Release. (A) Freeze-fracture electron micrograph of the cytoplasmic half of the presynaptic membrane in a frog nerve terminal (as if observed from the synaptic cleft). The region of the active zone appears as a slight ridge delineated by membrane particles (about 10 nm in diameter). (B) Similar view of a terminal that was frozen just at the time the nerve began to discharge large numbers of quanta (5 ms after stimulation). "Holes" (box) are sites of vesicle fusion; shallow depressions mark where vesicles have collapsed flat after opening. (C) Comparison of the number of vesicle openings (counted in freeze-fracture images) and the number of quanta released (determined from electrophysiological recordings). The diagonal line is the 1 : 1 relationship expected if each vesicle that opened released 1 quantum of transmitter. Transmitter release was varied by adding different concentrations of 4-AP (arrow indicates control, without 4-AP). (From Heuser et al., 1979; micrographs kindly provided by J. E. Heuser.)

мощью флуоресцентного микроскопа можно было наблюдать, как везикулы скапливаются у плазматической мембраны и исчезают по мере того, как их флуоресцентное содержимое высвобождается в результате экзоцитоза (рис. 11.18)[70, 71]. Исчезновение каждой из везикул сопровождалось высвобождением кванта медиатора, регистрируемого с помощью амперометрии. Оптические флуоресцентные методы были также использованы для исследования движения везикул внутри клеток, описания того, каким образом они подходят к плазматической мембране и скапливаются около нее перед слиянием[72, 73].

Таким образом, на сегодняшний день накоплены веские доказательства в пользу того, что синаптические везикулы являются морфологическим субстратом кванта медиатора и что каждая везикула содержит несколько тысяч молекул медиатора. Содержимое везикул может высвобождаться путем экзоцитоза спонтанно, с низкой частотой высвобождения (вызывая миниатюрные синаптические потенциалы), а также в ответ на пресинаптическую деполяризацию. Существует и иная точка зрения[74], однако другие механизмы, предложенные для объяснения квантового высвобождения, например, кальций-активируемые

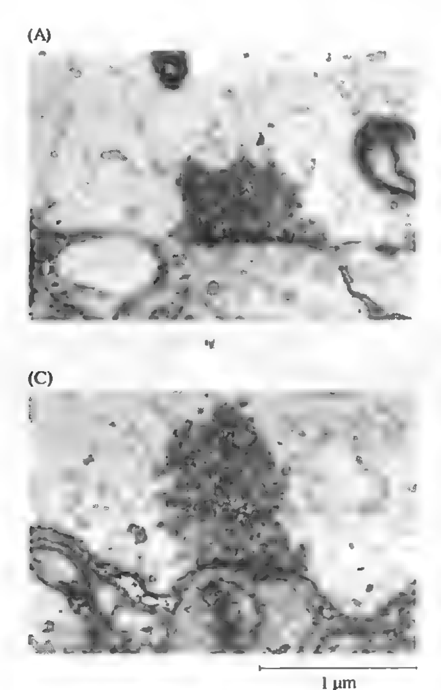
Рис. 11.18. Наблюдение за экзоцитозом в живых клетках. (A) Хромаффинные клетки были выращены на покровных стеклах и окрашены флуоресцентной меткой, которая концентрируется в хромаффинных везикулах. Одиночные везикулы, расположенные возле плазматической мембраны, визуализируются с помощью флуоресцентного микроскопа. Высвобождение катехоламинов одновременно детектируется с помощью амперометрии. (B) Изображения одной хромаффинной везикулы, полученные с интервалом в 2 с после того, как клетка была простимулирована раствором с повышенной концентрацией калия. Светящееся пятно в центре исчезает быстро и необратимо, как только везикула подвергается экзоцитозу и высвобождает свое флуоресцентное содержимое. (C) Временной ход экзоцитоза в ответ на увеличение внеклеточной концентрации калия, зарегистрированного с помощью амперометрической детекции высвобождения катехоламинов, а также по исчезновению флуоресцентных пятен. Обратите внимание на то, что высвобождение и исчезновение пятен совпадают (стрелкой отмечен один из примеров). Большее количество событий регистрируется с помощью амперометрии, поскольку амперометрический электрод детектирует экзоцитоз с большой поверхности клетки, в то время как измерение флюоресценции проводится лишь от небольшого участка клеточной поверхности.

Fig. 11.18. Exocytosis Observed in Living Cells. (A) Chromaffin cells growing on a glass coverslip in cell culture were labeled with a fluorescent dye, which becomes concentrated in chromaffin vesicles. Individual vesicles docked at the plasma membrane were visualized by evanescent-wave microscopy. At the same time, release of catecholamines was detected by amperometry. (B) High-power images of a single chromaffin vesicle at 2 s intervals after the cell was stimulated with high potassium. The spot disappears abruptly and permanently as the vesicle undergoes exocytosis and releases its fluorescent contents. (C) The time course of exocytosis in response to an increase in extracellular potassium concentration, as recorded by amperometric detection of catecholamine release and the disappearance of fluorescent spots. Note the coincidence of release and spot disappearance (the arrows mark one example). More events are recorded by amperometry than by fluorescence because the amperometric electrode detects exocytosis over a large part of the cell, while only a small portion of the cell surface is imaged by evanescent-wave microscopy. (After Steyer, Horstmann, and Almers, 1997; micrographs kindly provided by W. Almers.)

квантовые ворота в пресинаптической мембране, не получили достаточной экспериментальной поддержки. Как было замечено выше, в некоторых специализированных синапсах сетчатки деполяризация может высвобождать медиатор посредством транспортных белков в пресинаптической мембране, т. е. посредством механизма, который не является квантовым, не опосредован экзоцитозом везикул и не зависит от входа кальция[75, 76].

Круговорот синаптических везикул

Что происходит с опустошенной синаптической везикулой после того, как она освободила свой запас медиатора? Сливается ли она с пресинаптической мембраной или остается целой и возвращается обратно в цитоплазму, как только ее содержимое было высвобождено? В нервно-мышечном соединении и в синапсах ЦНС интенсивная стимуляция



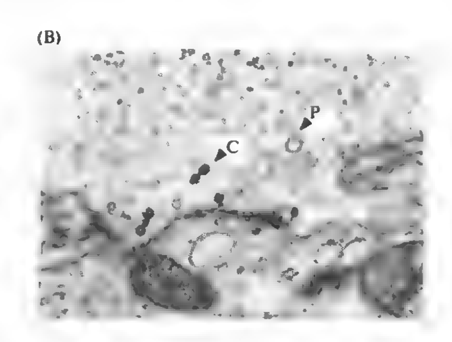


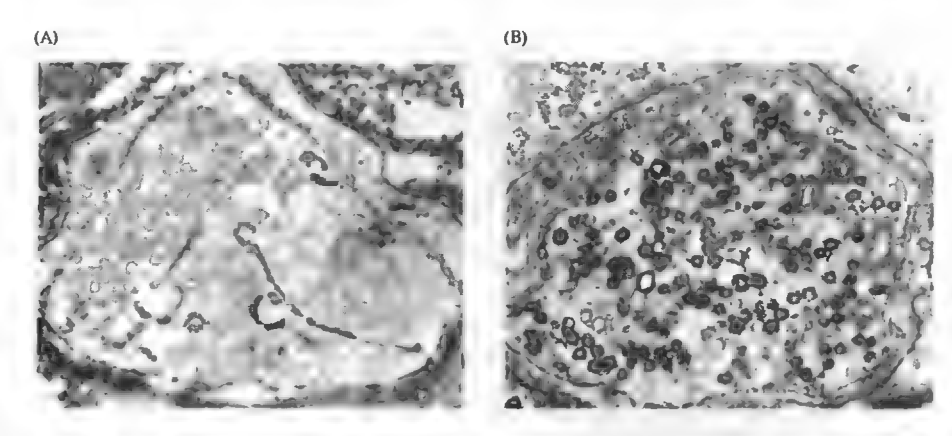
Рис. 11.19. Стимуляция вызывает обратимое исчезновение синаптических везикул в гигантских аксонах миноги. (А) Синапс в контрольных условиях, зафиксированный через 15 минут нахождения в растворе; синаптические везикулы сгруппированы у пресинаптической мембраны. (В) Синапс, зафиксированный после стимуляции спинного мозга с частотой 20 Гц на протяжении 15 минут. Обратите внимание на исчезновение синаптических везикул, на появление покрытых везикул (С) и плеоморфных везикул (Р), а также на увеличение поверхности пресинаптической мембраны. (С) Синапс, зафиксированный через 60 минут после прекращения стимуляции. Обратите внимание на сходство с синапсом в контроле на части А.

Fig. 11.19. Stimulation Causes a Reversible Depletion of Synaptic Vesicles in lamprey giant axons. (A) Control synapse fixed after 15 min in saline. Synaptic vesicles are clustered at the presynaptic membrane. (B) Synapse fixed after stimulation of the spinal cord for 15 min at 20 Hz. Note the depletion of synaptic vesicles, the presence of coated vesicles (C) and pleomorphic vesicles (P), and the expanded presynaptic membrane. (C) Synapse fixed 60 min after cessation of stimulation. Note similarities to the control synapse in A. (Micrographs kindly provided by W. O. Wickelgren.)

вызывает уменьшение количества синаптических везикул и увеличение площади поверхности аксонного окончания, указывая на то, что после высвобождения своего содержимого пустая везикула уплощается и становится частью мембраны окончания (рис. 11.19)[77)–79)].

Хеузер и Рииз[80)] обнаружили, что компоненты везикулярной мембраны вновь используются (рециклируются) в новые синаптические везикулы. Они исследовали рециклирование везикул в двигательных нервных окончаниях лягушки, стимулируя нервно-мышечный препарат в присутствии пероксидазы хрена (ПХ) — фермента, катализирующего образование электронно-плотного продукта реакции. На электронных микрофотографиях окончаний, зафиксированных после короткого периода электрической стимуляции, ПХ обнаруживалась главным образом в везикулах, располагающихся возле наружных краев синаптической области, что предполагает образование этих везикул из мембраны окончания посредством эндоцитоза и захват при этом ПХ из внеклеточного пространства (рис. 11.20). После небольшой задержки ПХ появлялась также в синаптических везикулах. Количество синаптических везикул, заполненных ПХ, уменьшалось при стимуляции в среде, не содержащей ПХ, что свидетельствует о том, что захваченная в результате эндоцитоза мембрана и ПХ рециклируется в популяцию везикул, которые впоследствии участвуют в высвобождении медиатора.

Состав мембраны синаптических везикул несколько отличается от плазматической мембраны нервных окончаний; тем не менее, определенные компоненты везикулярной мембраны захватываются обратно в цитоплазму вскоре после того, как везикулярная мембрана сливается с плазматической мембраной окончаний (рис. 11.21)[81)]. Полный цикл восстановления специфических мембранных белков и липидов проиллюстрирован на рис. 11.22[82)]. Компоненты везикулярной мембраны захватываются из пресинаптической мембраны посредством формирования покрытых везикул



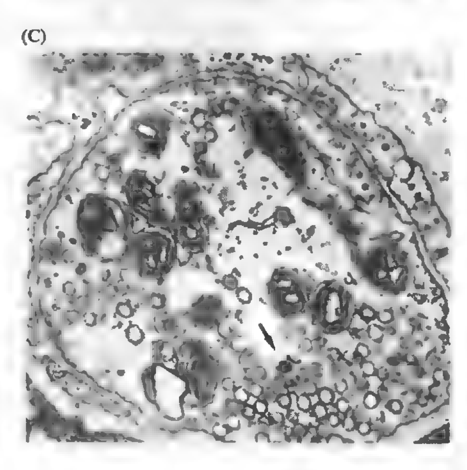


Рис. 11.20. Вторичное использование мембраны синаптических везикул. Электронные микрографии поперечных срезов нервно-мышечного соединения лягушки, окрашенных пероксидазой хрена (ПХ). (А) Нерв стимулировался в растворе, содержащем ПХ, на протяжении 1 минуты; электронно-плотный продукт реакции наблюдается во внеклеточном пространстве, а также в цистернах и покрытых везикулах. (B) Нерв стимулировался в течение 15 минут в присутствии ПХ, а затем восстанавливался в течение 1 часа в растворе, не содержащем ПХ. Многие синаптические везикулы содержат продукт реакции ПХ, указывая на то, что они образовались при эндоцитозе клеточной мембраны. (C) Аксонные окончания были загружены ПХ и затем восстановлены так же, как и на части B, после чего простимулированы второй раз и восстановлены еще через 1 час. Лишь небольшое количество везикул содержит продукт реакции ПХ (отмечено стрелкой), указывая на то, что захваченные при эндоцитозе мембрана и ПХ были рециклированы в популяцию везикул, которая участвует в процессе высвобождения.

Fig. 11.20. Recycling of Synaptic Vesicle Membrane. Electron micrographs of cross sections of frog neuromuscular junctions stained with horseradish peroxidase (HRP). (A) The nerve was stimulated for 1 min in saline containing HRP; electron-dense reaction product can be seen in the extracellular space and in cisternae and coated vesicles. (B) The nerve was stimulated for 15 min in HRP, then allowed to recover for 1 h while the HRP was washed out of the muscle. Many synaptic vesicles contain HRP reaction product, indicating that they have been formed from membrane retrieved by endocytosis. (C) The axon terminal was loaded with HRP and rested as in B, then stimulated a second time and allowed to recover an additional hour. Few vesicles are labeled (arrow), indicating that the recaptured membrane and enclosed HRP were recycled into the vesicle population from which release occurs. (From Heuser and Reese, 1973; micrographs kindly provided by J. E. Heuser.)

и рециклируются в новые синаптические везикулы либо напрямую, либо через эндосомы (см. также главу 13).

В результате особенно интенсивной стимуляции в присутствии ПХ наблюдается образование больших непокрытых углублений и цистерн, содержащих ПХ (см. рис. 11.20А). Непокрытые углубления и цистерны представляют собой неселективные инвагинации излишков синаптической мембраны[81]. По всей видимости, покрытые везикулы затем удаляют специфические компоненты из таких цистерн для последующего рециклирования напрямую или через эндосомы (см. рис. 11.22).

Наблюдения за экзоцитозом и эндоцитозом в живых клетках

Аналогичные эксперименты были проведены с использование высоко флуоресцентных меток для маркировки рециклированных везикул[83]. Внедренная Бетцом и коллегами, эта методика дает то важное преимущество, что кругооборот везикул можно наблюдать в живом препарате по вызываемым стиму-

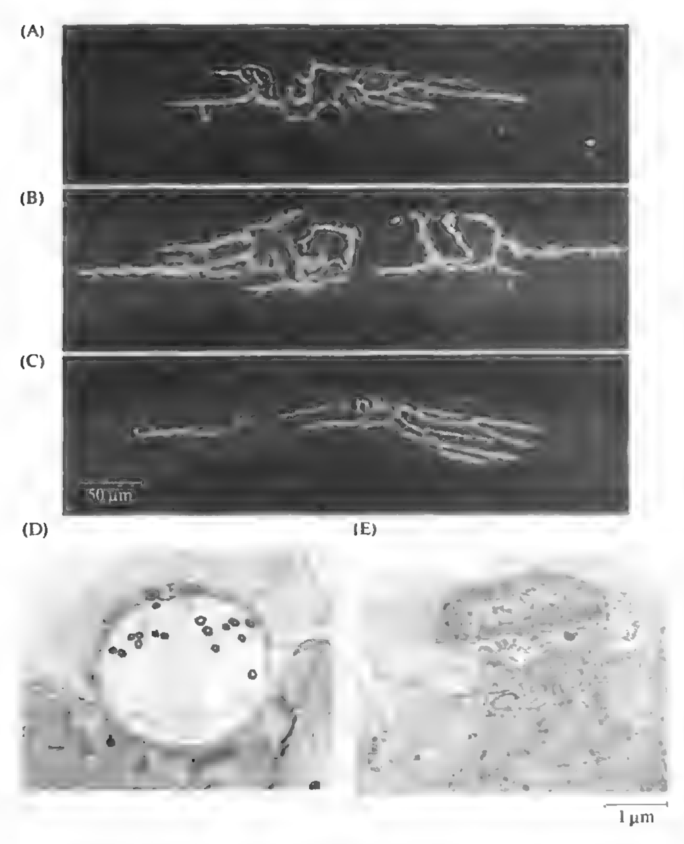


Рис. 11.21. Вторичное использование специфических белков мембраны синаптических везикул. (A–C) Флуоресцентные микрографии нервно-мышечных соединений лягушки, окрашенных антителами к синаптофизину (белок везикулярной мембраны) и вторичными антителами, конъюгированными с флюоресцеином. (D, E) Электронные микрофотографии поперечных срезов нервно-мышечных соединений. (A) Нервно-мышечное соединение в контроле. Мембрана аксонного окончания должна быть обработана детергентом, чтобы стать проницаемой для антител, связывающихся с синаптофизином. (B, D) Мышца была обработана α-латротоксином, который способен вызвать высвобождение медиатора в отсутствии кальция. Последующий эндоцитоз был предотвращен путем убирания кальция из наружного раствора. В этих условиях запас синаптических везикул в аксонных окончаниях истощается, окончания раздуваются, и их можно окрасить даже без предварительной обработки детергентом. Это указывает на то, что синаптические везикулы сливаются с мембраной в процессе экзоцитоза, что в условиях заблокированного обратного захвата везикулярной мембраны приводит к длительному нахождению синаптофизина на поверхности клетки. (C, E) Мышца была обработана α-латротоксином в нормальном растворе. Окончания выглядят нормально и могут быть окрашены только после обработки детергентом. В этих условиях популяция везикул поддерживается активным рециклированием, в то время как из окончания высвобождается в два раза больше квантов, чем их было в самом начале. В результате, несмотря на активное использование синаптических везикул, на поверхности окончания не обнаруживается следов синаптофизина, что демонстрирует специфичность и эффективность механизма обратного захвата везикулярной мембраны.

Fig. 11.21. Recycling of Specific Synaptic Vesicle Membrane Proteins. (A–C) Fluorescence micrographs of frog neuromuscular junctions labeled with antibodies to synaptophysin (a vesicle membrane protein) and fluorescein-conjugated second antibodies. (D, E) Electron micrographs of cross sections of neuromuscular junctions. (A) Normal junction. The axon terminal membrane must be made permeable with detergent in order for antibodies to reach synaptophysin. (B, D) Muscle was treated with α-latrotoxin, which causes quantal transmitter release in the absence of calcium. This was done in calcium-free medium, which blocks endocytosis. Under these conditions, axon terminals are depleted of synaptic vesicles, appear distended, and stain without being made permeable. This indicates that synaptic vesicles have fused with the terminal membrane during exocytosis while retrieval of vesicle membrane was blocked, leaving synaptophysin exposed on the surface. (C, E) Muscle was treated with α-latrotoxin in normal saline. Terminals have a normal appearance and can be stained only after being made permeable. Under these conditions the vesicle population is maintained by active recycling while more than two times the initial store of quanta is released. Thus, despite the active turnover of synaptic vesicles, no detectable synaptophysin remains on the terminal surface, demonstrating the specificity and efficiency of synaptic vesicle membrane retrieval. (From Valtorta et al., 1988; micrographs kindly provided by F. Valtorta.)

ляцией накоплению и высвобождению метки (рис. 11.23). Эти исследования позволили обнаружить, что в нормальных физиологических условиях полный цикл экзоцитоза обратного захвата и формирования новых синаптических везикул занимает менее 1 минуты[84)–86)]; восстановление же после более интенсивной стимуляции происходит медленнее[79)]. Более

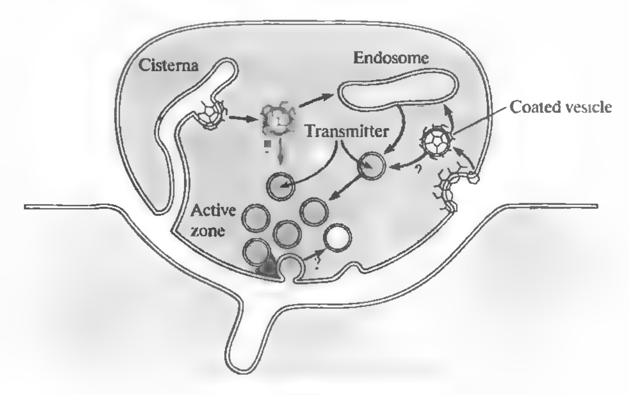


Рис. 11.22. Предполагаемые пути мембранного захвата в процессе вторичного использования везикул. После экзоцитоза везикулы, покрытые клатрином, селективно захватывают компоненты везикулярной мембраны. Новые синаптические везикулы образуются из покрытых везикул либо напрямую, либо через эндосомы. После интенсивной стимуляции наблюдается захват из непокрытых углублений в мембране, а также из цистерн. Новые синаптические везикулы, образовавшиеся из рециклированной мембраны, заполняются нейромедиатором и могут быть высвобождены при стимуляции.

Fig. 11.22. Proposed Pathways for Membrane Retrieval during vesicle recycling. After exocytosis, clathrin-coated vesicles selectively recapture synaptic vesicle membrane components. New synaptic vesicles are formed from coated vesicles, either directly or through endosomes. After intense stimulation, retrieval occurs from uncoated pits and cisternae. The new synaptic vesicles formed from recycled membrane are filled with transmitter and can be released by stimulation.

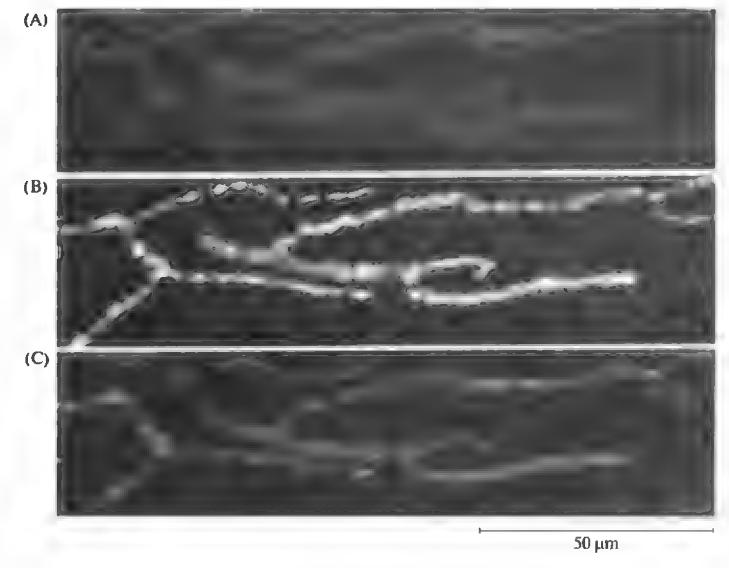


Рис. 11.23. Вызываемые активностью захват и высвобождение флуоресцентной метки в аксонных окончаниях нервно-мышечного соединения лягушки. Флуоресцентные микрографии аксонных окончаний в кожно-грудинной мышце. (A) Мышца была обработана флуоресцентной меткой (FM1–43, с концентрацией 2 мкмоль) в течение 5 минут и затем отмывалась на протяжении 30 минут. Лишь небольшое количество метки остается связанной с мембраной окончания. (B) Та же мышца была далее обработана меткой в течение 5 минут, в то время как нерв стимулировался с частотой 10 гЦ, и затем отмывалась на протяжении 30 минут. Флуоресцентные пятна являются кластерами синаптических везикул, которые были заполнены меткой в процессе рециклирования. (C) Та же мышца затем стимулировалась 5 минут с частотой 10 Гц и затем отмывалась в течение 30 минут.

Fig. 11.23. Activity-Dependent Uptake and Release of fluorescent dye by axon terminals at the frog neuromuscular junction. Fluorescence micrographs of axon terminals in a cutaneous pectoris muscle. (A) Muscle was bathed for 5 min in fluorescent dye (2 *μM* FM1–43) and washed for 30 min. Only small amounts of dye remain associated with the terminal membrane. (B) The same muscle was then bathed in dye for 5 min while the nerve was stimulated (10 Hz) and washed for 30 min. The fluorescent patches are clusters of synaptic vesicles that were filled with dye during recycling. (C) The same muscle was then stimulated at 10 Hz for 5 min and washed for 30 min. Stimulation released most of the dye. (Micrographs kindly provided by W. J. Betz.)

того, было показано, что захват флуоресцентных меток в пресинаптические бутоны культивируемых гиппокампальных нейронов происходит квантовым образом, причем размер каждого кванта соответствует захвату одной синаптической везикулы[87]. Такого рода квантовый захват происходит в течение секунд после начала стимуляции, предполагая,

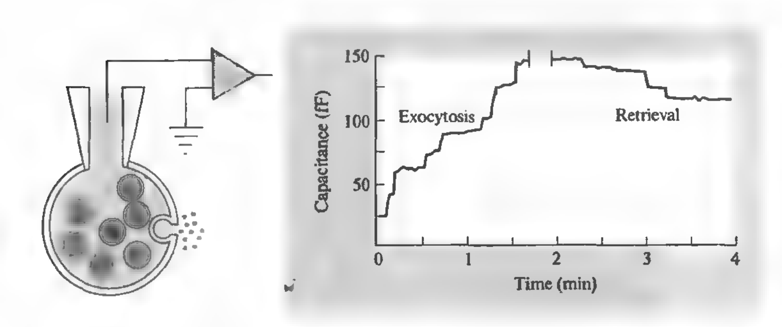


Рис. 11.24. Высвобождение медиатора и захват везикулярной мембраны, регистрируемый по изменению мембранной емкости. Увеличение емкости клетки при регистрации пэтч-электродом в конфигурации от целой клетки имеет ступенчатый характер, отражая слияние отдеяьных везикул с плазматической мембраной. Уменьшение емкости происходит при обратном захвате везикул.

Fig. 11.24. Release and Retrieval of Vesicle Membrane monitored by changes in membrane capacitance. Increases in cell capacitance measured with the whole-cell patch pipette recording technique occur in a stepwise fashion reflecting the fusion of individual vesicles with the plasma membrane. Corresponding decreases in capacitance are seen during vesicle retrieval. The recordings are from a rat mast cell, which has particularly large secretory vesicles (800 nm in diameter). (After Fernandez, Neher, and Gomperts, 1984.)

что одиночные события экзоцитоза и эндоцитоза очень близко связаны. Эта методика позволяет анализировать квантовое высвобождение из отдельных пресинаптических бутонов без регистрации постсинаптических ответов. Поскольку регистрирующие электроды не нужны, эти оптические методы оказываются весьма удобными при исследовании пресинаптической функции и долговременной пластичности.

Многообещающим подходом для исследований экзоцитоза везикул является использование не нейрональных секреторных клеток, например, клеток молочной железы и хромаффинных клеток, в которых экзоцитоз больших и плотных секреторных гранул может быть исследован одновременно с помощью световой микроскопии, электрофизиологической регистрации и амперометрии, которая позволяет детектировать амины, выделяемые этими клетками[88, 89)]. Слияние одиночных гранул с плазматической мембраной может быть зарегистрировано пэтч-электродом в виде увеличения электрической емкости клетки, которое возникает при добавлении мембранных гранул к клеточной поверхности; обратный же захват мембраны при эндоцитозе приводит к уменьшению емкости (рис. 11.24)[90)]. Алмерс с соавторами в экспериментах на хромаффинных клетках добавили электрод из угольного волокна внутрь пэтч-электрода, чтобы измерить высвобождение катехоламинов, содержащихся в гранулах[91)]. Высвобождение обычно детектировалось одновременно с увеличением емкости, как это можно было бы предположить в случае экзоцитоза и включения гранулярной мембраны в плазматическую (рис. 11.25). Однако примерно 15 % событий высвобождения сопровождались кратковременным и неполным увеличением емкости. В этих случаях экзоцитоз, по всей видимости, происходил через маленькое, открываемое на короткое время отверстие (fusion pore), которое затем быстро закрывалось, позволяя грануле отойти обратно в цитоплазму без включения ее в наружную мембрану (рис. 11.25D). Такие события типа «поцеловал и убежал» (kiss and run) могут позволить освобождаться маленьким молекулам, например, катехоламинам, чей запас может быть быстро восстановлен, но задерживать при этом большие белки, потеря которых может быть восполнена только путем синтеза абсолютно новых гранул в аппарате Гольджи.

Изменения емкости, связанные с высвобождением множественных квантов, были измерены в одиночных нервных окончаниях, выделенных из ЦНС позвоночных[92, 93)]. Пока еще технически невозможно регистрировать изменение емкости, связанные со слиянием одиночных синаптических везикул. Хотя полное слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной явно происходит во время интенсивной стимуляции, остается неясным, может ли происходить в нормальных физиологических условиях высвобождение по механизму «поцеловать и убежать»[94, 95)].

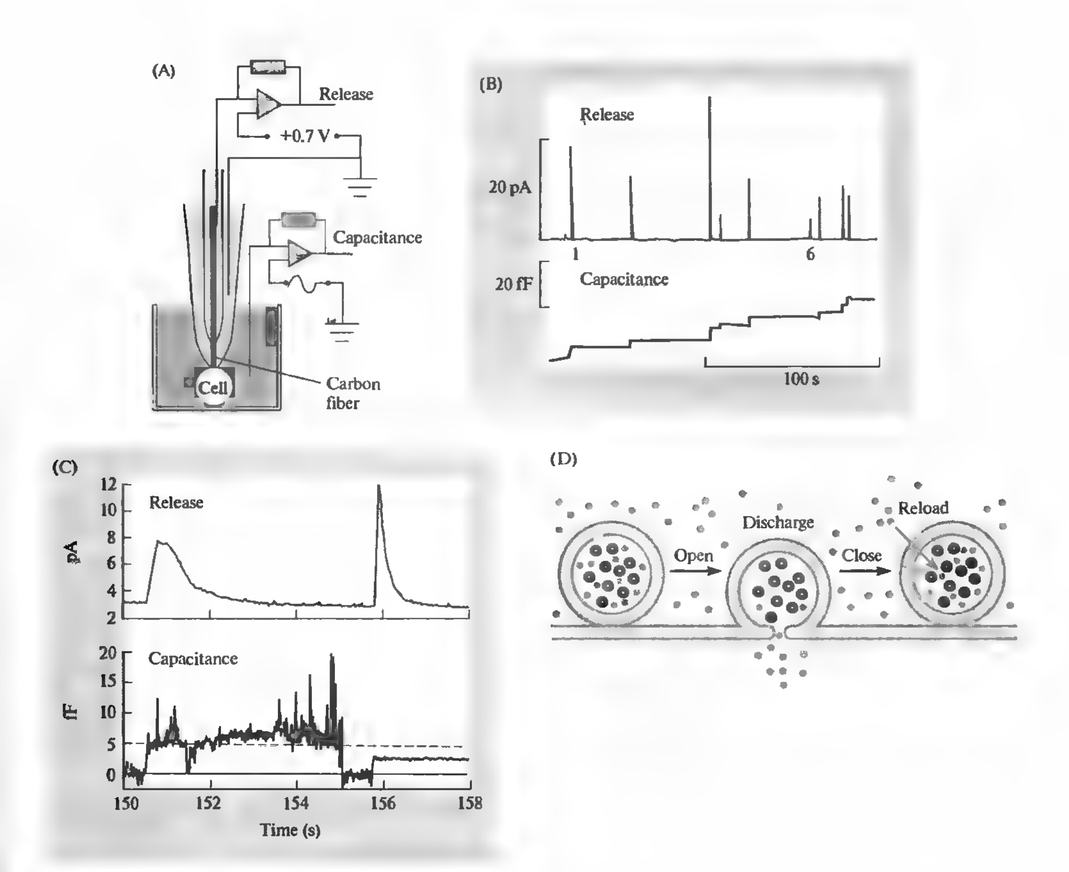


Рис. 11.25. Увеличение емкости мембраны и высвобождение катехоламинов из хромаффинных клеток. (A) Электрод, изготовленный из угольного волокна и расположенный внутри пэтч-электрода, измеряет высвобождение катехоламина амперометрическим способом, в то время как сам электрод используется для измерения емкости в пределах регистрируемого участка мембраны. (B) Одновременная регистрация высвобождения катехоламинов (вверху) и емкости (внизу). Все события экзоцитоза, зарегистрированные по высвобождению катехоламина, совпадают с увеличением емкости. (C) Шестое и седьмое события экзоцитоза (из части B рисунка) показаны на увеличенной временной шкале. Шестое событие экзоцитоза совпадает с кратковременным и довольно шумящим увеличением емкости, которая длится около 5 с. Седьмое событие совпадает с быстрым и длительным увеличением емкости. (D) Кратковременное увеличение емкости может соответствовать экзоцитозу через отверстие, образующееся при частичном слиянии везикул с мембраной, который длится короткое время, заканчиваясь отсоединением везикулы от мембраны и уходом обратно в цитоплазму без включения в плазматическую мембрану. В этих условиях могут высвобождаться маленькие молекулы, в то время как большие белки остаются внутри везикулы.

Fig. 11.25. Coincident Increases in Membrane Capacitance and Release of Catecholamines from chromaffin cells. (A) A carbon fiber electrode inside the patch pipette measures catecholamine release by amperometry, while at the same time the electrode is used to measure capacitance within the patch. (B) Simultaneous recording of catecholamine release (top trace) and capacitance (bottom trace). All exocytic events detected by catecholamine release coincide with increases in capacitance. (C) The sixth and seventh exocytic events in part B, displayed on an expanded scale. The sixth exocytic event coincides with a transient, flickering increase in capacitance that lasts about 5 s. The seventh exocytic event coincides with an abrupt and long-lasting increase in capacitance. (D) Transient increases in capacitance may correspond to exocytosis through a temporary fusion pore that rapidly closes, allowing the vesicle to pinch back off into the cytoplasm without ever becoming incorporated into the plasma membrane. Under such circumstances small molecules may be released while larger proteins are retained in the vesicle. (After Albillos et al., 1997.)

Выводы

- Деполяризация окончания аксона приводит к открыванию потенциал-активируемых кальциевых каналов, увеличению внутриклеточной концентрации кальция и высвобождению медиатора.
- Медиатор высвобождается в виде мультимолекулярных квантов, что происходит при слиянии синаптических везикул, заполненных медиатором, с плазматической мембраной и высвобождении их содержимого путем экзоцитоза. Помимо этого существует также постоянная неквантовая утечка медиатора из окончаний аксонов в состоянии покоя.
- Синаптическая задержка между началом пресинаптической деполяризации и началом постсинаптического потенциала обусловлена временем, необходимым для деполяризации нервного окончания, открывания кальциевых каналов и увеличения внутриклеточной концентрации кальция, который запускает процесс экзоцитоза.
- В покое экзоцитоз происходит с низкой частотой, вызывая спонтанный миниатюрный синаптический потенциал. В ответ на потенциал действия от 1 до 300 квантов (в зависимости от типа синапса) высвобождается практически одновременно.
- Синаптические везикулы содержат несколько тысяч молекул медиатора. Количество постсинаптических рецепторов, активируемых одним квантом медиатора, варьирует значительно, в пределах от 15 до 1 500, в зависимости от типа синапсов.
- Распределение амплитуд спонтанных миниатюрных и вызванных постсинаптических потенциалов может быть проанализировано статистическими методами для определения размера кванта и квантового состава. Эффективность синаптической передачи может модулироваться на пресинаптическом уровне за счет изменения квантового состава, а также на постсинаптическом уровне за счет изменения размера кванта.
- В результате экзоцитоза мембраны синаптических везикул могут сливаться с плазматической мембраной. Компоненты везикулярной мембраны затем специфично захватываются обратно путем эндоцитоза покрытых везикул и рециклируются при формировании новых синаптических везикул. В определенных условиях высвобожденные везикулы могут возвращаться обратно в цитоплазму без включения в клеточную мембрану.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Cochilla, A. J., Angleson, J. K., and Betz, W. J. 1999. Monitoring secretory membrane with FM1–43 fluorescence. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 1–10.
- Llinàs, R. 1982. Calcium in synaptic transmission. *Sci. Am.* 247(4): 56–65.
- Olivera, B. M., Miljanich, G. P., Ramachandran, J., and Adams, M. E. 1994. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: The omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 823–867.
- Parnas, H., Segel, L., Dudel, J., and Parnas, I. 2000. Autoreceptors, membrane potential and the regulation of transmitter release. *Trends Neurosci.* 23: 60–68.
- Redman, S. 1990. Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol. Rev.* 70: 165–198.
- Walmsley, B., Alvarez, F. J., and Fyffe, R. E. W. 1998. Diversity of structure and function at mammalian central synapses. *Trends Neurosci.* 21: 81–88.
- Zucker, R. S. 1993. Calcium and transmitter release. *J. Physiol.* (*Paris*) 87: 25–36.

Статьи

- Adler, E. M., Augustine, G. J., Duffy, S. N., and Charlton, M. P. 1991. Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J. Neurosci.* 11: 1496–1507.
- Betz, W. J., and Bewick, G. S. 1993. Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 460: 287–309.
- Boyd, I. A., and Martin, A. R. 1956. The end-plate potential in mammalian muscle. *J. Physiol.* 132: 74–91.
- del Castillo, J., and Katz, B. 1954. Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.* 124: 560–573.
- Edwards, F. A., Konnerth, A., and Sakmann, B. 1990. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: A patch-clamp study. *J. Physiol.* 430: 213–249.

- Fatt, P., and Katz, B. 1952. Spontaneous subthreshold potentials at motor nerve endings. *J. Physiol.* 117: 109–128.
- Fernandez, J. M., Neher, E., and Gomperts, B. D. 1984. Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature* 312: 453–455.
- Heuser, J. E., and Reese, T. S. 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57: 315–344.
- Heuser, J. E., Reese, T. S., Dennis, M. J., Jan, Y., Jan, L., and Evans, L. 1979. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell Biol.* 81: 275–300.
- Katz, B., and Miledi, R. 1967. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol.* 192: 407–436.
- Katz, B., and Miledi, R. 1967. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J. Physiol.* 189: 535–544.
- Kuffler, S. W., and Yoshikami, D. 1975. The number of transmitter molecules in a quantum: An estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J. Physiol.* 251: 465–482.
- Llinàs, R., Sugimori, M., and Silver, R. B. 1992. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256: 677–679.
- Miller, T. M., and Heuser, J. E. 1984. Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 98: 685–698.
- Ryan, T. A., Reuter, H., and Smith, S. J. 1997. Optical detection of a quantal presynaptic membrane turnover. *Nature* 388: 478–482.
- Steyer, J. A., Horstmann, H., and Almers, W. 1997. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388: 474–478.

Цитированная литература

1. Morita, K., and Barrett, E. F. 1990. *J. Neurosci.* 10: 2614–2625.
2. Bullock, T. H., and Hagiwara, S. 1957. *J. Gen. Physiol.* 40: 565–577.
3. Heidelberger, R., and Matthews, G. 1992. *J. Physiol.* 447: 235–256.
4. Martin, A. R., and Pilar, G. 1963. *J. Physiol.* 168: 443–463.
5. Borst, J. G. G., and Sakmann, B. 1996. *Nature* 383: 431–434.
6. Katz, B., and Miledi, R. 1967. *J. Physiol.* 192: 407–436.
7. Katz, B., and Miledi, R. 1965. *J. Physiol.* 181: 656–670.
8. Parnas, H., Segel, L., Dudel, J., and Parnas, I. 2000. *Trends Neurosci.* 23: 60–68.
9. del Castillo, J., and Stark, L. 1952. *J. Physiol.* 116: 507–515.
10. Dodge, F. A., Jr., and Rahamimoff, R. 1967. *J. Physiol.* 193: 419–432.
11. Schwartz, E. A. 1987. *Science* 238: 350–355.
12. Penner, R., and Neher, E. 1988. *J. Exp. Biol.* 139: 329–345.
13. Kasai, H. 1999. *Trends Neurosci.* 22: 88–93.
14. Katz, B., and Miledi, R. 1967. *J. Physiol.* 189: 535–544.
15. Llinás, R. 1982. *Sci. Am.* 247(4): 56–65.
16. Llinás, R., Sugimori, M., and Silver, R. B. 1992. *Science* 256: 677–679.
17. Adler, E. M., et al. 1991. *J. Neurosci.* 11: 1496–1507.
18. Hochner, B., Parnas, H., and Parnas, I. 1989. *Nature* 342: 433–435.
19. Delany, K. R., and Zucker, R. S. 1990. *J. Physiol.* 426: 473–498.
20. Zucker, R. S. 1993. *J. Physiol. (Paris)* 87: 25–36.
21. Heidelberger, R., et al. 1994. *Nature* 371: 513–515.
22. Linial, M., Ilouz, N., and Parnas, H. 1997. *J. Physiol.* 504: 251–258.
23. Fatt, P., and Katz, B. 1952. *J. Physiol.* 117: 109–128.
24. Kuffler, S. W., and Yoshikami, D. 1975. *J. Physiol.* 251: 465–482.
25. del Castillo, J., and Katz, B. 1954. *J. Physiol.* 124: 586–604.
26. Brooks, V. B. 1956. *J. Physiol.* 134: 264–277.
27. Birks, R., Katz, B., and Miledi, R. 1960. *J. Physiol.* 150: 145–168.
28. Reiser, G., and Miledi, R. 1989. *Brain Res.* 479: 83–97.
29. Katz, B., and Miledi, R. 1977. *Proc. R. Soc. Lond. B* 196: 59–72.
30. Vyskocil, F., Nikolsky, E., and Edwards, C. 1983. *Neuroscience* 9: 429–435.
31. del Castillo, J., and Katz, B. 1954. *J. Physiol.* 124: 560–573.
32. Johnson, E. W., and Wernig, A. 1971. *J. Physiol.* 218: 757–767.
33. Rahamimoff, R., and Fernandez, J. M. 1997. Pre- and postfusion regulation of transmitter release. *Neuron* 18: 17–27.
34. Stjurne, L., et al. 1994. *Molecular and Cellular Mechanisms of Neurotransmitter Release.* Raven, New York.

35. Blackman, J. G., and Purves, R. D. 1969. *J. Physiol.* 203: 173–198.
36. Martin, A. R., and Pilar, G. 1964. *J. Physiol.* 175: 1–16.
37. Redman, S. 1990. *Physiol. Rev.* 70: 165–198.
38. Edwards, F. A., Konnerth, A., and Sakmann, B. 1990. *J. Physiol.* 430: 213–249.
39. Kuno, M. 1964. *J. Physiol.* 175: 81–99.
40. Walmsley, B., Alvarez, F. J., and Fyffe, R. E. W. 1998. *Trends Neurosci.* 21: 81–88.
41. Bekkers, J. M. 1994. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 360–365.
42. Magleby, K. L., and Weinstock, M. M. 1980. *J. Physiol.* 299: 203–218.
43. Katz, B., and Miledi, R. 1972. *J. Physiol.* 244: 665–699.
44. Gold, M. R., and Martin, A. R. 1983. *J. Physiol.* 342: 85–98.
45. Jonas, P., Major, G., and Sakmann, B. 1993. *J. Physiol.* 472: 615–663.
46. Villanueva, S., Fiedler, J., and Orrego, F. 1990. *Neuroscience* 37: 23–30.
47. Hartzell, H. C., Kuffler, S. W., and Yoshikami, D. 1975. *J. Physiol.* 251: 427–463.
48. Salpeter, M. M. 1987. In *The Vertebrate Neuromuscular Junction.* Alan R. Liss, New York, pp. 1–54.
49. Harris, K. M., and Landis, D. M. M. 1986. *Neuroscience* 19: 857–872.
50. Schikorski, T., and Stevens, C. F. 1997. *J. Neurosci.* 17: 5858–5867.
51. Denis, M. J., and Miledi, R. 1974. *J. Physiol.* 239: 571–594.
52. Erxleben, C. and Kriebel, M. E. 1988. *J. Physiol.* 400: 659–676.
53. Vautrin, J., and Kriebel, M. E. 1991. *Neuroscience* 41: 71–88.
54. Drachman, D. B. 1994. *New England J. Med.* 330: 1797–1810.
55. Reger, J. F. 1958. *Anat. Rec.* 130: 7–23.
56. Birks, R., Huxley, H. E., and Katz, B. 1960. *J. Physiol.* 150: 134–144.
57. Robitaille, R., Adler, E. M., and Charlton, M. P. 1990. *Neuron* 5: 773–779.
58. Cohen, M. W., Jones, O. T., and Angelides, K. J. 1991. *J. Neurosci.* 11: 1032–1039.
59. Sugiura, Y., et al. 1995. *J. Neurocytol.* 24: 15–27.
60. Olivera, B. M., et al. 1994. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 823–867.
61. Heuser, J. E., Reese, T. S., and Landis, D. M. D. 1974. *J. Neurocytol.* 3: 109–131.
62. Peper, K., et al. 1974. *Cell Tissue Res.* 149: 437–455.
63. Porter, C. W., and Barnard, E. A. 1975. *J. Membr. Biol.* 20: 31–49.
64. Kirshner, N. 1969. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 1: 71–89.
65. Smith, A. D., et al. 1970. *Tissue Cell* 2: 547–568.
66. Silinsky, E. M., and Redman, R. S. 1996. *J. Physiol.* 492: 815–822.
67. Wagner, J. A., Carlson, S. S., and Kelly, R. B. 1978. *Biochemistry* 17: 1199–1206.
68. Heuser, J. E., et al. 1979. *J. Cell Biol.* 81: 275–300.
69. Heuser, J. E., and Reese, T. S. 1981. *J. Cell Biol.* 88: 564–580.
70. Lang, T., et al. 1997. *Neuron* 18: 857–863.
71. Steyer, J. A., Horstmann, H., and Almers, W. 1997. *Nature* 388: 474–478.
72. Steyer, J. A., and Almers, W. 1999. *Biophys. J.* 76: 2262–2271.
73. Oheim, M., et al. 1999. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 307–318.
74. Dunant, Y., and Israel, M. 1998. *Neurochem. Res.* 23: 709–718.
75. Cammack, J. N., and Schwartz, E. A. 1993. *J. Physiol.* 472: 81–102.
76. Cammack, J. N., Rakhilin, S. V., and Schwartz, E. A. 1994. *Neuron* 13: 949–960.
77. Ceccarelli, B., and Hurlbut, W. P. 1980. *Physiol. Rev.* 60: 396–441.
78. Dickinson-Nelson, A., and Reese, T. S. 1983. *J. Neurosci.* 3: 42–52.
79. Wickelgren, W. O., et al. 1985. *J. Neurosci.* 5: 1188–1201.
80. Heuser, J. E., and Reese, T. S. 1973. *J. Cell Biol.* 57: 315–344.
81. Valtorta, F., et al. 1988. *J. Cell Biol.* 107: 2717–2727.
82. Miller, T. M., and Heuser, J. E. 1984. *J. Cell Biol.* 98: 685–698.
83. Cochilla, A. J., Angleson, J. K., and Betz, W. J. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 1–10.
84. Betz, W. J., and Bewick, G. S. 1993. *J. Physiol.* 460: 287–309.
85. Ryan, T. A., et al. 1993. *Neuron* 11: 713–724.
86. Teng, H., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 4855–4866.
87. Ryan, T. A., Reuter, H., and Smith, S. J. 1997. *Nature* 388: 478–482.
88. Penner, R., and Neher, E. 1989. *Trends Neurosci.* 12: 159–163.
89. Angleson, J. K., and Betz, W. J. 1997. *Trends Neurosci.* 20: 281–287.
90. Fernandez, J. M., Neher, E., and Gomperts, B. D. 1984. *Nature* 312: 453–455.
91. Albillos, A., et al. 1997. *Nature* 389: 509–512.
92. Lim, N. F., Nowycky, M. C., and Bookman, R. J. 1990. *Nature* 344: 449–451.
93. von Gersdorff, H., and Matthews, G. 1997. *J. Neurosci.* 17: 1919–1927.
94. Fesce, R., et al. 1994. *Trends Cell Biol.* 4: 1–4.
95. Klingauf, J., Kavalali, E. T., and Tsien, R. W. 1998. *Nature* 394: 581–585.

Глава 12

Синаптическая пластичность

Эффективность синаптической передачи не фиксирована и может изменяться как следствие изменения паттерна текущей активности. Короткие залпы потенциалов действия в пресинаптическом нейроне могут вызвать либо облегчение (фасилитацию) выделения медиатора из пресинаптической терминали на несколько сотен миллисекунд, либо подавление выделения медиатора на секунды, либо комбинацию этих процессов. Вторая фаза фасилитации, называемая усиление (augmentation), также может длиться секунды. Длинные залпы потенциалов действия в пресинаптическом нейроне могут вызвать посттетаническую потенциацию (ПТП), которая характеризуется увеличением выделения медиатора на десятки минут. Увеличение концентрации кальция в пресинаптической терминали лежит в основе этих изменений выделения медиатора.

Во многих синапсах повторяющаяся активность может вызвать не только кратковременные, но и долговременные изменения синаптической эффективности, которые длятся часы и даже дни. Два явления этого рода известны как долговременная потенциация (ДВП) и долговременная депрессия (ДВД). ДВП опосредована увеличением концентрации кальция в постсинаптической клетке, которое запускает каскады систем вторичных посредников (мессенджеров), активность которых приводит к появлению дополнительных рецепторов в постсинаптической мембране и увеличивает чувствительность рецепторов. ДВД появляется в ответ на сравнительно меньшее увеличение концентрации кальция в постсинаптической клетке и сопровождается уменьшением количества и чувствительности постсинаптических рецепторов.

Некоторые формы ДВП и ДВД вовлекают пресинаптические механизмы. Обе эти формы пластичности считаются основой различных форм обучения и формирования памяти, но имеющиеся в настоящее время данные пока не предоставили безоговорочных доказательств этой гипотезы.

До настоящего времени мы обсуждали передачу возбудительных и тормозных сигналов в активированных синапсах в терминах одиночного потенциала действия, приходящего по пресинаптической терминали, деполяризации терминали, входа кальция и высвобождения медиатора, приводящего к де- или гиперполяризации постсинаптической мембраны в зависимости от свойств постсинаптических рецепторов. В этих условиях ответы каждого данного синапса относительно стереотипны и постоянны, если не считать естественную вариабельность. Однако при нормальной работе мозга синапсы активируются не отдельными потенциалами действия (ПД), а непрерывными потоками ПД разной частоты и регулярности.

Такая текущая активность может оказывать эффективное воздействие на синаптическую передачу. Например, при стимуляции пресинаптического волокна коротким залпом стимулов результирующие постсинаптические потенциалы могут либо увеличиваться (синаптическая **фасилитация**), либо уменьшаться (синаптическая **депрессия**). Эти изменения сохраняются и после окончания вызвавшей их активности, и их классифицируют в соответствии с длительностью сохранения (рис. 12.1). Фасилитация появляется мгновенно и длится все время стимуляции. После того, как залповая стимуляция заканчивается, ответы на одиночные тестовые стимулы показывают, что увеличение синаптической эффективности длится несколько сотен миллисекунд. Более длительная фаза фасилитации, длящаяся несколько секунд, называется **усилением** ответа (augmentation).

В тех случаях, когда активность синапсов приводит к депрессии, восстановление происходит также за несколько секунд. Относительно длительный, высокочастотный залп стимулов (обычно называемый тетанусом, потому что при приложении такого залпа стимулов к мышце или моторному нерву происходит

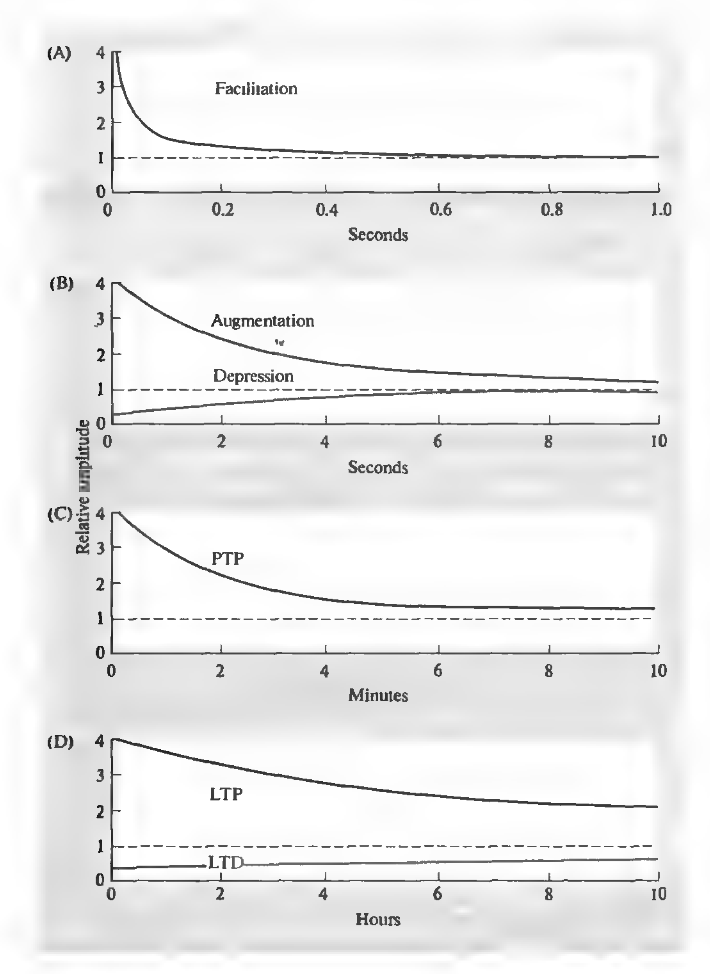


Рис. 12.1. Динамика изменений эффективности синаптической передачи, вызванная ритмической активацией. (А) фасилитация; (В) усиление и депрессия; (С) ПТП; (D) ДВП.

Fig. 12.1. Time Courses of Activity-Induced Changes in synaptic transmission. (A) The main component of facilitation decays over a period of about 100 ms, with a smaller phase persisting for several hundred ms. (B) Recovery from depression is complete, and augmentation is largely dissipated, by 10 s. (C) PTP lasts for more than 10 min, and (D) LTP and LTD last well beyond 10 h.

тетаническое мышечное сокращение) обычно приводит к синаптической депрессии, вслед за которой через несколько секунд наблюдается увеличение амплитуды синаптического потенциала, которое может длиться десятки минут. Это называется **посттетанической потенциацией (ПТП)**. Ритмичная активация синапсов в центральной нервной системе может вызывать еще более длительные изменения в синаптической передаче, называемые **долговременной потенциацией** (ДВП) и **долговременной депрессией** (ДВД). Эти явления могут длиться многие часы и даже дни.

При исследовании механизмов, лежащих в основе долговременных изменений эффективности синапсов, прослеживается общая нить. Существенная часть регуляции синаптической передачи опосредована изменениями концентрации внутриклеточного кальция в пресинаптической терминали и/или постсинаптической клетке. Таким образом, синаптическая регуляция существенно зависит от механизмов прохождения ионов кальция через плазматическую мембрану и их мобилизации из внутриклеточных депо. Эти механизмы, которые включают как прямую активацию кальциевых каналов (глава 9), так и сложные системы вторичных посредников (глава 10), являются средством регуляции синаптической эффективности во временных рамках от миллисекунд до часов.

§ 1. Кратковременные изменения

Кратковременные изменения эффективности синаптической передачи наиболее интенсив-

но были изучены в синапсах периферической нервной системы, таких как синапсы скелетных мышц или автономных ганглиев. Тем не менее, подобные изменения были показаны и практически во всех отделах центральной нервной системы. В настоящем разделе мы обсудим фасилитацию, усиление, депрессию и ДВП нервно-мышечного синапса лягушки и цилиарного ганглия цыпленка. Эти изменения «кратковременные», так как их длительность варьирует от десятков миллисекунд (фасилитация) до десятков минут (ДВП). В особых условиях на этих экспериментальных моделях ДВП может длиться часами.

Фасилитация и депрессия выброса медиатора

Во многих синапсах наиболее быстрый эффект ритмической стимуляции заключается в фасилитации ответа. Это проиллюстрировано на рис. 12.2, на котором показаны потенциалы концевой пластинки нервно-мышечного соединения лягушки, вызванные коротким залпом импульсов, приходящим по моторному нерву. Амплитуда потенциалов (измеренная от начальной точки переднего фронта) увеличивается во время залпа. Более того, эффект наблюдается существенно дольше, чем длится залп стимулов, так что ответ на тестовый стимул через 230 мс все еще больше, чем первый ответ в последовательности. Фасилитация может быть разделена на два неравных компонента: больший компонент уменьшается с постоянной времени около 50 мс, тогда как второй компонент уменьшается с постоянной времени около 250 мс[1]. Показано, что фасилитация происходит из-за увеличения среднего количества квантов медиатора (m; см. гл. 11), высвобождаемого в пресинаптическом окончании[2)–4)]. Дальнейший статистический анализ выброса медиатора в нервно-мышечном соединении рака привел к предположению, что увеличение m происходит скорее благодаря увеличению p, которое отражает вероятность выброса медиатора, чем из-за увеличения n — количества готовых к выбросу квантов медиатора[5]. Количество медиатора, высвобождаемое из терминали, может удваиваться при фасилитации.

Синаптическая депрессия может наблюдаться в тех случаях, когда количество квантов медиатора, высвобождаемых залпом стимулов, велико. В эксперименте, показанном на рис. 12.2А, амплитуда потенциалов концевой пластинки была уменьшена понижением концентрации кальция в омывающем растворе; в этом случае начальный квантовый состав потенциалов был небольшим (10 или менее). Похожий эксперимент при большой концентрации кальция показан на рис. 12.2В. В этом эксперименте квантовый выброс значительно больше, но ответы были уменьшены по амплитуде блокадой постсинаптических АХ рецепторов при помощи кураре. При ритмической стимуляции ответы становились все меньше по амплитуде. Как и в случае с фасилитацией, депрессия длится дольше залпа стимулов.

Депрессия потенциала концевой пластинки, как и фасилитация, имеет пресинаптическую природу. Ее механизм не полностью ясен, но тот факт, что для депрессии необходима исходно большая величина квантового выброса медиатора, предполагает, что истощение количества пузырьков в пресинаптической терминали во время залпов стимулов может быть одним из определяющих факторов депрессии[6]. Вторым фактором может являться модуляция выброса АХ из пресинаптической терминали совместным выбросом АТФ (глава 13). АТФ гидролизуется до аденозина, который затем влияет на пресинаптическую терминаль и уменьшает квантовый состав ответа[7]. АТФ и сам может угнетать секрецию медиатора через собственные пресинаптические P2 рецепторы (Giniatullin and Sokolova, 1998). После длительного периода ритмической стимуляции депрессия может быть очень сильной, уменьшая амплитуду синаптического потенциала более, чем на 80%.

В заключение можно сказать, что выброс медиатора из пресинаптических терминалей может претерпевать два типа относительно кратковременных модификаций. Первая, фасилитация, происходит благодаря увеличению эффективности выброса квантов из пресинаптической терминали. Вторая, депрессия, может быть связана как с истощением количества квантов, так и с уменьшением эффективности выброса. На рис. 12.2С проиллюстрировано взаимодействие этих двух эффектов. Во время залпов импульсов начальный эффект фасилитации преобладает над депрессией, и синаптический ответ растет по амплитуде. Позднее, когда дается тестовый стимул, фасилитация уже ослабла, и начинает преобладать депрессия, которая длится дольше.

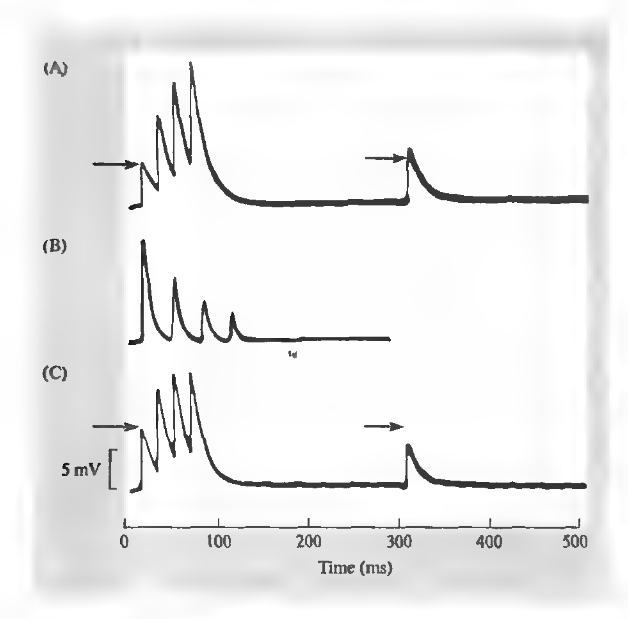


Рис. 12.2. Фасилитация и депрессия в нервно-мышечном синапсе позвоночных.

Fig. 12.2. Facilitation and Depression at the vertebrate neuromuscular junction. (A) Muscle bathed in low calcium solution to reduce the quantum content of the response. Amplitudes of the end-plate potentials increase progressively during a train of four impulses. The response to a test pulse 230 ms later is still facilitated (arrows indicate initial amplitude). (B) Similar experiment with a curarized preparation in high calcium solution. The response amplitudes decrease progressively during the train. (C) Interaction between facilitation and depression in normal calcium concentration. There is no further facilitation after the second response because of the onset of depression, and the test response at 230 ms is depressed. (A and C after Mallart and Martin, 1968; B after Lundberg and Quilisch, 1953.)

Роль кальция в фасилитации

Данные, полученные Катцем и Миледи[8], позволяют предположить, что фасилитация выброса медиатора на второй из парных потенциалов действия (ПД) связана с остаточным внутриклеточным кальцием, вызванным предшествующим ПД. В ряде работ были исключены некоторые другие возможные механизмы этого феномена. Например, в синапсах цилиарного ганглия цыпленка было показано, что фасилитация не является следствием увеличения амплитуды или длительности второго ПД в пресинаптической терминали[9]. Показано также, что фасилитация второго ответа в синапсах между нейронами пиявки происходит без увеличения входа кальция в пресинаптическую терминаль[10]. Таким образом, наиболее вероятной является гипотеза о том, что фасилитация связана с остаточным кальцием в терминали. При ритмической стимуляции накопление внутриклеточного кальция приводит к прогрессивному увеличению выброса медиатора, как показано на рис. 12.2А. Некоторые теоретические подходы, используемые при исследовании связи между кинетикой концентрации внутриклеточных ионов кальция и динамикой фасилитации, можно найти в обзоре[11].

Усиление синаптической передачи

Охарактеризовав временное течение фасилитации и депрессии, Маглеби и Зенгель обнаружили дополнительный эффект ритмической стимуляции, который они назвали усилением (augmentation)[12, 13]. Усиление представляет собой вызванное ритмической стимуляцией увеличение амплитуды синаптического потенциала, которое развивается значительно медленнее, чем фасилитация, и спадает за более длительный период с постоянной времени от 5 до 10 с (рис. 12.1В). Как фасилитация, так и усиление происходят из-за увеличения выброса медиатора из пресинаптической терминали. В нервно-мышечном соединении лягушки усиление и фасилитация вместе могут увеличить амплитуду синаптического потенциала более чем в пять раз.

Посттетаническая потенциация

ПТП подобна фасилитации и усилению в том, что она отражает увеличение выброса из пресинаптической терминали, вызванное предшествующей стимуляцией. Различие состоит в том, что ПТП начинается существенно позже, достигает максимума через несколько секунд после конца стимуляции и длится десятки минут. На рис. 12.3 показан пример эксперимента на клетке цилиарного ганглия цыпленка, обработанной кураре для уменьшения амплитуды ВПСП. Кроме того, для предотвращения запуска ПД клетка была гиперполяризована (длинные отклонения вниз на рис. 12.3А) перед стимуляцией пресинапти-

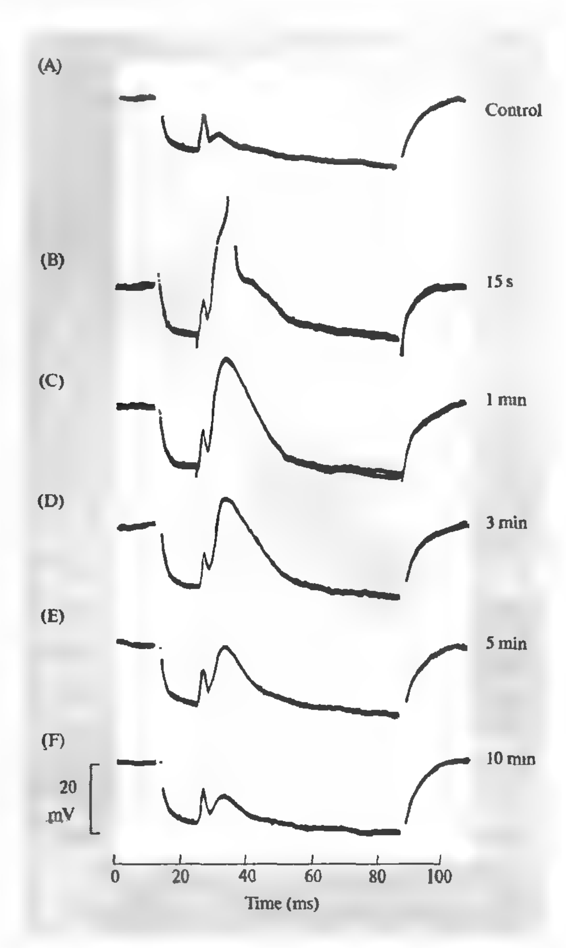


Рис. 12.3. Посттетаническая потенциация возбудительного постсинаптического потенциала (ВПСП) в клетке цилиарного ганглия цыпленка, вызванная стимуляцией нерва. (A) контрольная запись до потенциации; (B) ответ через 15 с после залпа в 1 500 стимулов; (C–F) ответы на тест-стимулы через 1, 3, 5 и 10 мин после тетанизации.

Fig. 12.3. Posttetanic Potentiation of the excitatory postsynaptic potential (EPSP) in a chick ciliary ganglion cell, produced by preganglionic nerve stimulation. Potentials were recorded with an intracellular microelectrode. To prevent action potential initiation, the EPSP amplitude was reduced with curare, and a hyperpolarizing pulse was applied through the recording electrode before each stimulus. (A) The control record shows electrical coupling potential (brief depolarization) followed by a small EPSP. (B) The response recorded 15 s after the end of a train of 1 500 stimuli applied to the preganglionic nerve. The EPSP amplitude is more than six times greater than the control, giving rise to an action potential. The amplitude of the coupling potential is unchanged. (C–F) Test stimuli at 1, 3, 5, and 10 min after the tetanus show the slow decline of potentiation, with the EPSP in the last record still more than twice the control value. (From Martin and Pilar, 1964.)

ческого нейрона. Первое отклонение вверх на каждой записи представляет собой потенциал электрической связи между стимулируемой и регистрируемой клеткой; более медленная деполяризация представляет собой ВПСП, вызванный выбросом АХ из пресинаптической терминали (глава 9). В данном случае анализу подвергается ВПСП. Изначально амплитуда ВПСП была только около 4 мВ (из-за присутствия кураре). Затем пресинаптический нерв раздражался с частотой 100 импульсов в секунду в течение 15 с, что вызвало кратковременное уменьшение ВПСП (не показано). Через 15 секунд одиночный стимул вызвал ВПСП амплитудой более 20 мВ, который превысил порог и вызвал ПД (рис. 12.3B). Ответы на последующие стимулы постепенно уменьшались (рис. 12.3C–F), но даже через 10 минут после конца тетанической стимуляции ответ был вдвое больше начального.

Как и фасилитация, ПТП имеет пресинаптическое происхождение. Это означает, что ПТП вызвана увеличенным выбросом медиатора из пресинаптической терминали, скорее всего, из-за увеличения концентрации внутриклеточного кальция. Точный механизм этого явления неясен, но эксперименты на нервно-мышечном соединении лягушки показали, что ПТП зависит от входа кальция в терминаль во время залпа стимулов. Например, если убрать кальций из омывающего раствора во время стимуляции, то потенциация не будет наблюдаться[14]. В отличие от кальция, вход натрия не является необходимым, так как ПТП может быть вызвана аппликацией деполяризационных импульсов на терминаль в присутствии тетродотоксина[15]. В этих

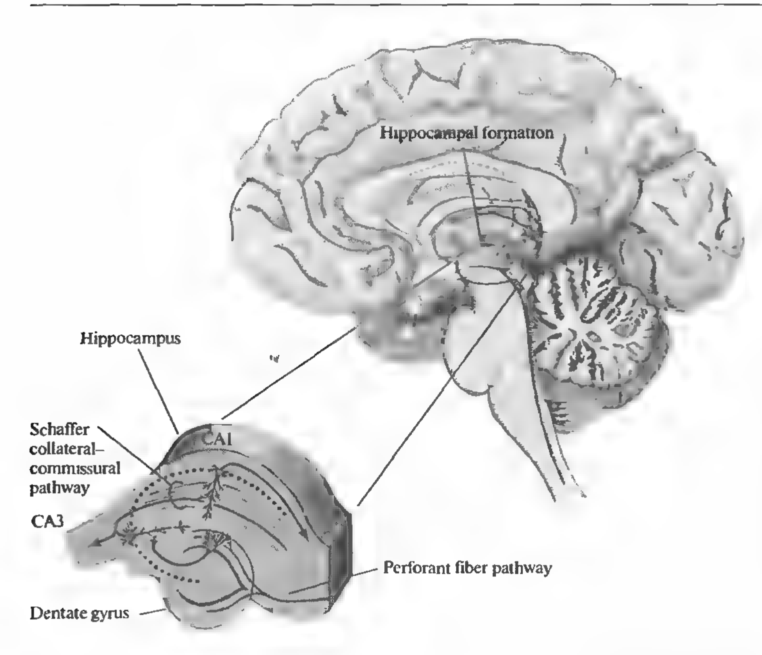


Рис. 12.4. Гиппокампальная формация.

Fig. 12.4. The Hippocampal Formation lies buried in the temporal lobe and consists of two interlocking C-shaped strips of cortex, the dentate gyrus and the hippocampus, together with the neighboring subiculum. Pyramidal cells in area CA1 are innervated by the Schaffer collateral–commissural pathway. Granule cells in the dentate gyrus are innervated by the perforant fiber pathway from the subiculum and, in turn, innervate CA3 cells.

условиях величина потенциации увеличивается с увеличением концентрации экстраклеточного кальция. При очень высоких концентрациях кальция (83 ммоль) потенциация после 500 стимулов длится более двух часов.

Несмотря на то, что натрий не нужен для потенциации, его вход влияет на длительность ПТП. Потенциация нервно-мышечного соединения крысы удлиняется воздействиями, которые блокируют выведение натрия Na–K АТФазой, например, добавлением уабаина или удалением калия из омывающего раствора[16]. Увеличение длительности ПТП может происходить из-за того, что увеличенная концентрация внутриклеточного натрия уменьшает скорость выведения накопленного кальция Na–Ca обменом. ПТП в нервно-мышечном соединении рака также уменьшается по величине и длительности при воздействиях, которые влияют на обмен кальция между цитоплазмой и внутриклеточными хранилищами, например, митохондриями[17]. Эти эксперименты позволяют предположить, что вход кальция во время тетануса приводит к быстрому наполнению внутриклеточных хранилищ кальция. Накопленный кальций после тетануса медленно высвобождается в цитоплазму, поддерживая повышенную концентрацию свободного кальция в цитоплазме.

§ 2. Долговременные изменения

Ритмическая активность нейронов центральной нервной системы может вызывать изменения синаптической эффективности, которые длятся значительно дольше, чем в периферических синапсах. Длительные изменения могут наблюдаться в разных частях мозга, и это явление особенно интересно тем, что может быть связано с памятью.

Долговременная потенциация

Долговременная потенциация (ДВП) впервые была описана Блисс, Ломо в 1973 году в глутаматергических синапсах гиппокампальной формации[18]. Эта структура находится в височной области мозга и состоит из двух областей, известных как гиппокамп и зубчатая фасция, которые на срезе видны как две полоски коры С-образной формы, взаимно охватывающие друг друга и субикулума (рис. 12.4). Упорядоченное расположение клеток и входных путей позволяет стереотаксически ввести в мозг животного электроды точно к определенным типам клеток и внутриклеточно регистрировать синаптические потенциалы. Соответственно, легко расположить и стимулирующие электроды на специфических входных путях.

Рис. 12.5. Долговременная потенциация (ДВП) в гиппокампе анестезированного кролика. (А) Синаптические ответы на стимуляцию перфорантного пути регистрировались в гранулярных клетках зубчатой фасции. (В) Короткие тетанусы (15 ст/с в теч. 10 с) наносятся в отмеченные стрелками моменты.

Fig. 12.5. Long-Term Potentiation (LTP) in the hippocampus of an anesthetized rabbit. (A) Synaptic responses to perforant fiber pathway stimulation were recorded from granule cells in the dentate gyrus. (B) Brief tetanic stimuli (15/s for 10 s) were given at times marked by the arrows. Each tetanus caused an increase in the amplitude of the synaptic response (grey circles), eventually lasting for hours. In the same cell, responses to stimulation of a control pathway not receiving tetanic stimulation (black circles) were unchanged. (After Bliss and Lømo, 1973.)

Блисс и Ломо показали значительное увеличение синаптических входов клеток зубчатой фасции в результате высокочастотной стимуляции входов к этим клеткам, которое длится часы и даже дни (рис. 12.5). Сейчас это явление известно как **гомосинаптическая ДВП**. Несмотря на то, что ДВП была показана и в других областях мозга, включая несколько отделов новой коры, и даже в нейромышечном соединении ракообразных[19)], наиболее интенсивно это явление было изучено на срезах гиппокампа[20, 21)].

Ассоциативная ДВП в пирамидных клетках гиппокампа

Браун с соавторами показали, что для возникновения ДВП ассоциированная во времени слабая стимуляция двух входов эффективнее раздельной стимуляции[22)]. Это явление названо **ассоциативной ДВП**. Пример этого явления показан на рис. 12.6. Внутриклеточно отводилась активность пирамидных клеток области CA1 гиппокампа. Два экстраклеточных стимулирующих электрода были расположены на входных путях (коллатерали Шаффера) таким образом, чтобы активировать разные субпопуляции аксонов, активирующих дендритное дерево пирамидной клетки (рис. 12.6А). Интенсивность стимуляции была подобрана таким образом, что электрод I вызывал большой синаптический потенциал в пирамидной клетке, тогда как электрод II существенно меньший.

Синаптические ответы на стимуляцию через электрод II показаны на рис. 12.6В. Короткий залп импульсов (100 Гц в течение 1 секунды, повторенный через 5 с) через электрод I привел к усилению ответов, активируемых через этот вход (не показано). Тетанизация, примененная через электрод I, не оказала влияния на величину ответа, вызываемого входом II (рис. 12.6В, второй ответ). Кроме того, высокочастотная тетанизация через вход II также не вызвала изменений тестового ответа на этот вход (третий ответ). Однако после совместной стимуляции входов I и II наблюдалось существенное увеличение величины ответа на вход II (четвертый ответ), длящееся десятки минут (рис. 12.6С). Это явление было названо ассоциативной ДВП, так как длительное увеличение ответа на вход II происходило

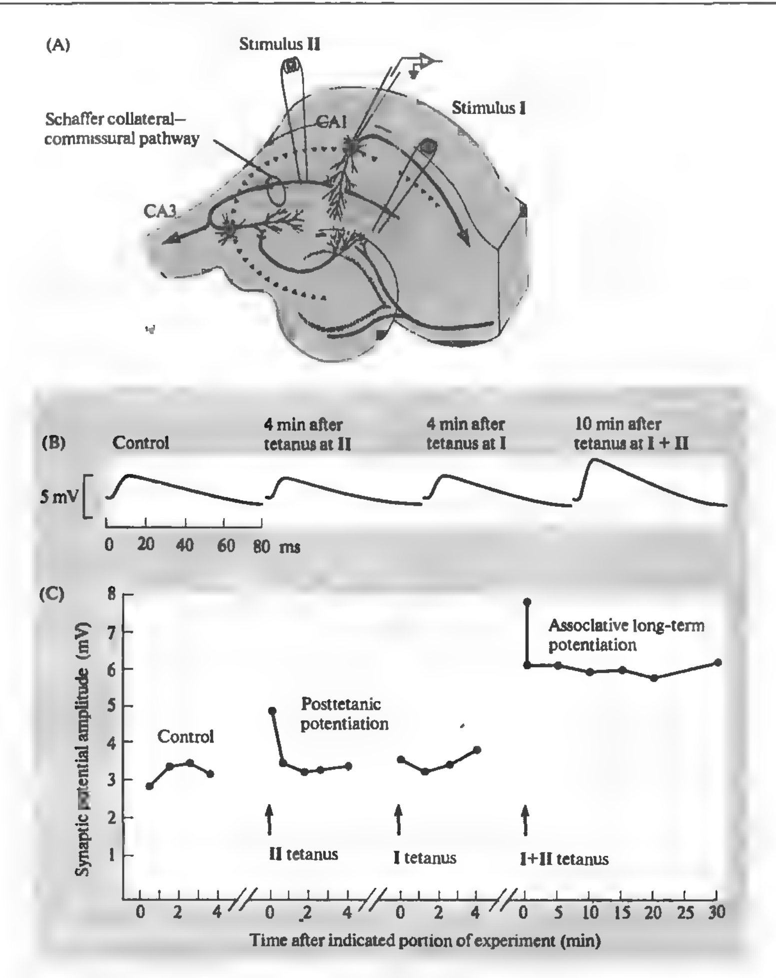


Рис. 12.6. Ассоциативная ДВП в срезах гиппокампа. (А) Схема эксперимента; (В) усредненные ответы; (С) суммированные результаты.

Fig. 12.6. Associative LTP in a rat hippocampal slice. (A) Intracellular records were made from a CA1 pyramidal cell while stimulating two distinct groups of presynaptic fibers in the Schaffer collateral–commissural pathway (stimulus I and stimulus II). The stimuli were adjusted so that responses to stimulation at site I were five times greater than those to stimulation at site II. (B) Averaged responses to stimulation at site II in the control condition, after tetanic stimulation at site II (100 stimuli/s for 1 s), after a similar tetanus at site I, and after a combined tetanus at I and II. Only the combined tetanus produced potentiation; test shock 10 min later indicated a twofold increase in response amplitude. (C) Summary of the results in part B, showing the time course of the changes in response amplitude. Stimulation at site I had no effect, stimulation at II produced a brief potentiation of the response, and combined stimulation produced long-term potentiation. (After Barrionuevo and Brown, 1983.)

только при совпадении во времени стимуляции этого входа и входа I.

Механизмы индукции ДВП

Полной картины происходящих во время индукции ДПВ явлений пока еще нет. Однако все исследователи согласны с тем, что увеличение концентрации кальция в постсинаптической клетке является важным фактором. В пирамидных клетках поля CA1 индукция происходит с участием кальция, входящего через глутаматные NMDA рецепторы (глава 3). NMDA рецепторы образуют каналы для катионов с необычной характеристикой — эти каналы заблокированы при нормальном

потенциале покоя клетки. Канал блокирован ионами магния из экстраклеточного раствора, которые освобождают канал только при деполяризации участка мембраны с этими глутаматными рецепторами[23, 24]. Большая часть глутамат-чувствительных клеток экспрессирует NMDA и не-NMDA (AMPA) рецепторы в постсинаптической мембране, которые активируются при выделении глутамата из пресинаптических терминалей[25].

NMDA рецепторы обладают относительно высокой кальциевой проводимостью, однако вход кальция зависит от величины деполяризации, которая должна быть достаточна для снятия магниевого блока в каналах. Именно этим можно объяснить то, что в эксперименте по активации ассоциативной ДВП стимуляция только одного (слабого) входа II не вызывала достаточной синаптической деполяризации для снятия магниевого блока и входа кальция. Однако, когда эта стимуляция сопровождалась деполяризацией, вызванной активацией входа I, NMDA рецепторы оказались разблокированы, что привело к входу кальция и ДВП. Участие NMDA рецепторов подтверждено экспериментами, в которых антагонисты NMDA блокируют индукцию ДВП, но не мешают ДВП при применении после индукции[26, 27].

Идея о том, что ДВП индуцируется увеличением концентрации кальция в постсинаптической мембране, поддержана двумя типами доказательств. Во-первых, было экспериментально показано увеличение концентрации внутриклеточного кальция во время стимуляции, при этом блокада увеличения градиента этого катиона внутриклеточно введенными буферами устраняет ДВП[28, 29]. Во-вторых, увеличение концентрации кальция в постсинаптической клетке благодаря извлечению его из других внутриклеточных источников приводит к длительному увеличению амплитуды ВПСП[30]. Таким образом, источник кальция не является существенным, поэтому в некоторых синапсах ДВП индуцируется входом кальция через потенциалзависимые кальциевые каналы, тогда как в других — высвобождением кальция из внутриклеточных депо[29].

Увеличенная концентрация внутриклеточного кальция может активировать целый ряд внутриклеточных биохимических путей. Наиболее важны для индукции ДВП активация кальций/кальмодулин-зависимой киназы II (CaMKII) и цАМФ-зависимая протеин-киназы[21, 31]. CaMKII обнаружена в больших количествах в постсинаптических уплотнениях шипиков дендритов, и внутриклеточная инъекция блокаторов CaMKII блокирует индукцию ДВП[32, 33]. Кроме того, индукция ДВП нарушена у мышей с генетическими нарушениями синтеза одной из субъединиц CaMKII[34]. Блокада цАМФ-зависимой протеин-киназы также существенно уменьшает ДВП[29, 32, 33].

Механизм проявления ДВП

Открытие ДВП поставило вопрос о том, является ли наблюдаемое увеличение амплитуды синаптического потенциала результатом увеличенного выброса передатчика из пресинаптической терминали или изменения чувствительности постсинаптической мембраны. Привлекательным казалось предположение о том, что ДВП, так же как фасилитация, усиление и ПТП, отражает увеличение квантового состава синаптического ответа, что и было показано в первых экспериментах. На рис. 12.7 показано распределение амплитуд синаптических потенциалов до и после потенциации. В ряде экспериментов статистический анализ распределений амплитуд показал увеличение среднего квантового содержания[21, 35, 36]. Однако в других экспериментах были показаны противоположные результаты: увеличение ВПСП происходило благодаря изменению размера одного кванта, а не количества квантов в ответе[37].

Увеличение квантового содержания потенциированного ответа с одной стороны и увеличение размера кванта рассматриваются в настоящее время как указывающие на различные механизмы проявления ДВП: пресинаптический (выделяется больше квантов) и постсинаптический (больший ответ на каждый квант). Новые данные говорят в пользу того, что увеличение и квантового содержания, и числа квантов опосредованы изменениями в постсинаптической мембране.

Молчащие синапсы

Каким образом изменения в постсинаптической клетке могут проявляться в изменении количества выделяемых квантов? Было бы неправильно думать, что постсинаптическая мембрана является статической структурой, и единственным механизмом увеличения квантового содержания ПСП может быть увеличение количества квантов, выделяемых пресинаптической терминалью. Предположим, что несколько пресинаптических

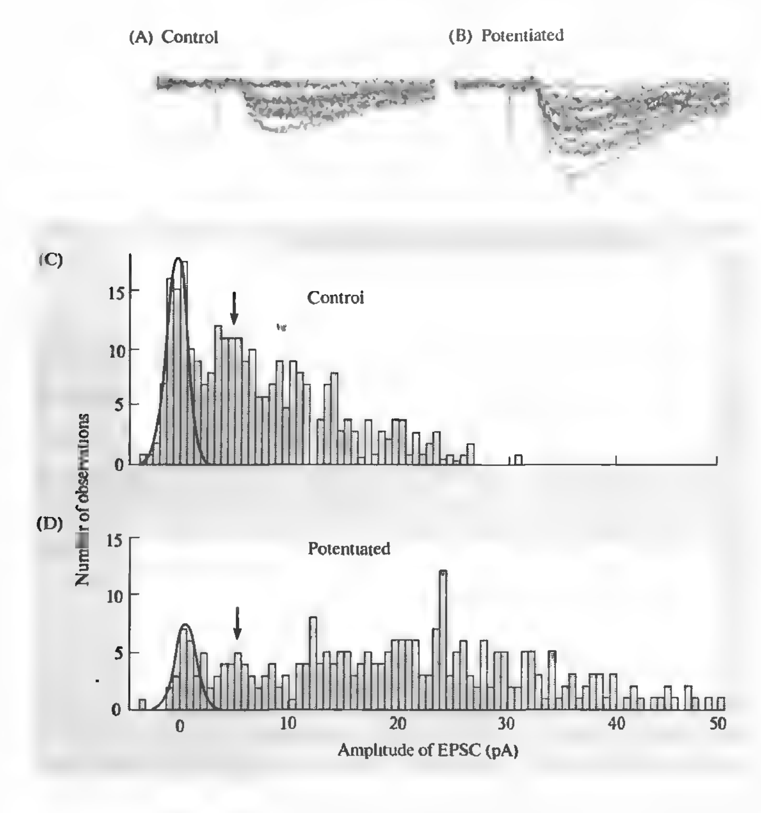


Рис. 12.7. Изменения квантового содержания синаптических ответов нейронов гиппокампа крысы при ДВП. (А, В) 16 наложенных синаптических токов до (А) и после (В) индукции ДВП. (С, D) Распределение амплитуд токов до (С) и после (D) индукции ДВП.

Fig. 12.7. Change in Quantum Content of synaptic responses during LTP. Records from a rat hippocampal slice. (A, B) Sixteen superimposed whole-cell records of excitatory synaptic currents (EPSCs) in a CA1 pyramidal cell (A) before and (B) after a conditioning train of stimuli. Note the quantal steps in the current amplitudes. After conditioning, the fraction of failures is decreased and there are many more multiquantal responses. (C, D) Distribution of current amplitudes (C) before and after (D) conditioning. The normal curve is fitted to baseline noise (failures); arrows indicate mean current produced by a single quantum. After potentiation, the number of failures is reduced and the mean current is increased in amplitude by a factor of almost three, while the single-quantum current is unchanged. (After Malinow and Tsien, 1990.)

бутонов контактируют с постсинаптической мембраной дендритного шипика, который содержит всего несколько работающих АМРА рецепторов, или их совсем нет. В условиях покоя выброс глутамата в таком синапсе вызовет очень маленький или никакого ответа — такой синапс будет «молчащим»[21]. Предположим, после индукции ДВП новые глутаматные АМРА рецепторы будут включены в постсинаптическую мембрану молчащего синапса. Эти рецепторы начнут отвечать на кванты медиатора, выбрасываемые из пресинаптической терминали, и квантовый состав ответа соответственно увеличится (рис. 12.8).

Регуляция количества синаптических рецепторов

В настоящее время существуют доказательства того, что при вызове ДВП АМРА рецепторы увеличиваются в количестве. Показано, что субъединицы АМРА рецепторов доставляются в шипики дендритов после ритмической стимуляции, сопровождающейся активацией NMDA рецепторов[38]. Субъединица АМРА рецептора GluR1 (см. главу 3), меченая зеленым флуоресцентным пептидом (GFP), была экспрессирована в нейронах гиппокампа в культуре. Анализ распределения меченой субъединицы в отростках с помощью лазерной сканирующей микроскопии и электронной микроскопии показал, что большая часть GluR1-GFP находится в дендритах. После стимуляции нейронов, меченые рецепторы быстро появились и в тех дендритах, где их раньше не было. Эти данные позволяют предположить, что многие дендритные шипики являются молчащими и получают полный набор АМРА рецепторов после ритмической стимуляции.

Дополнительные свидетельства увеличения количества АМРА рецепторов были сум-

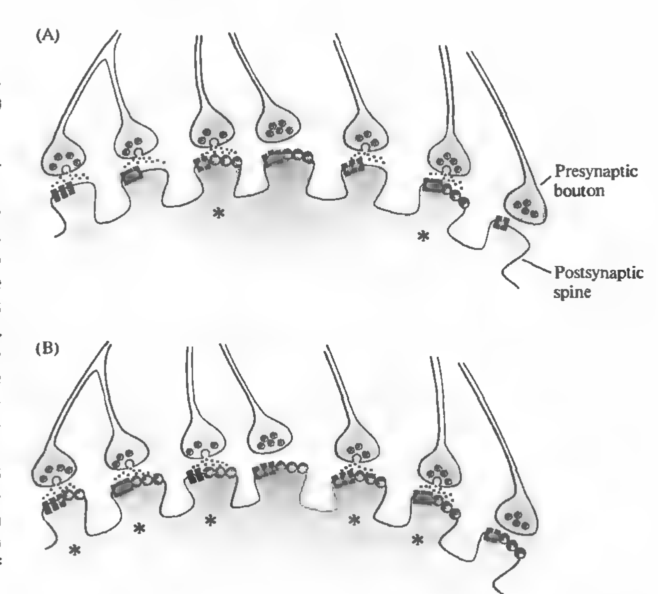


Рис. 12.8. Предполагаемый механизм увеличения квантового содержания при ДВП.

Fig. 12.8. Proposed Mechanism for Increased Quantum Content during LTP. (A) Release of five quanta of glutamate from pre-synaptic boutons (indicated by omega figures) activates only two postsynaptic spines (asterisks) because many spines contain no AMPA receptors (grey circles) and are "silent". Thus, the quantum content of the response is two, even though five quanta are released. NMDA receptors (blackrectangles) are activated only if depolarization is sufficient to remove magnesium block. (B) During LTP, AMPA receptors are inserted into the postsynaptic membranes of the spines and the quantum content of the response is increased to five, with no change in the number of quanta released.

мированы Маленка и Николл[21)]. Например, иммуногистохимически было показано, что все синапсы, образованные коллатералями Шаффера и комиссуральными волокнами, содержат NMDA рецепторы, но только часть содержит также AMPA рецепторы[39)]. Соответственно, в электрофизиологических экспериментах были показаны в большом количестве синапсы пирамидных клеток поля CA1, которые активировались только NMDA; AMPA ответы регистрировались только во время ДВП[40, 41)]. Идея о появлении новых ответов в связи с появлением новых рецепторов в мембране поддержана наблюдением о том, что ДВП уменьшается при инъекции в постсинаптическую клетку соединений, затрудняющих слияние мембран, которое, как предполагается, происходит при встраивании новых рецепторов[42)].

В других экспериментах было показано, что после индукции ДВП на дендритах пирамидных клеток поля CA1 появляются новые шипики[43)]. Потенциация синаптического ответа примерно на 80 % сопровождается увеличением плотности распределения шипиков примерно на 13 %.

Текущая точка зрения на факторы, влияющие на индукцию и проявление ДВП, схематически показана на рис. 12.9. Примерно половина дендритных шипиков содержит в основном NMDA рецепторы, которые не отвечают на глутамат при потенциале покоя. При достаточной деполяризации синапса ритмическая синаптическая активация приводит к входу кальция. Входящий кальций связывается с кальмодулином. Комплекс Са-кальмодулин активирует CaMKII, которая автофосфорилируется, превращаясь в форму, сохраняющую активность спустя долгое время после возвращения концентрации кальция к начальному уровню. CaMKII оказывает двойной эффект на синаптическую передачу:

(1) фосфорилирует AMPA рецепторы в мембране, увеличивая их проводимость для ионов и увеличивая таким образом размер кванта;
(2) облегчает мобилизацию резервных AMPA рецепторов из цитоплазмы в плазматическую мембрану, поэтому больше постсинаптических сайтов доступно для активации квантами глутамата, высвобождаемого из терминали.

Представленная схема событий при ДВП усложняется разнообразными модулирующими влияниями, включающими более чем 100 разных молекул и рецепторов. Обсуждение этого можно найти в обзорах[21, 44)].

Пресинаптическая ДВП

Несмотря на то, что идея о постсинаптическом механизме ДВП подтверждена экспериментально, существуют давно известные

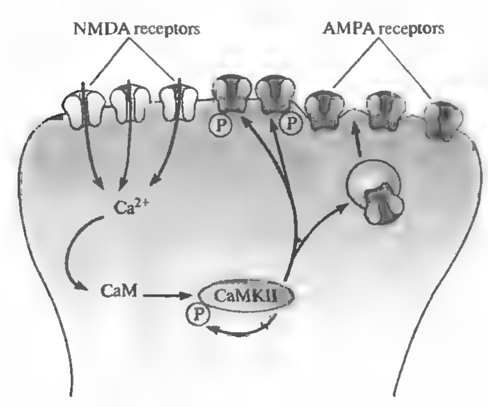


Рис. 12.9. Предлагаемый механизм ДВП.

Fig. 12.9. Proposed Mechanism for LTP. Activation of NMDA receptors allows calcium entry into the spine, activating CaMKII, which undergoes autophosphorylation, thereby maintaining its own activity after calcium concentration has returned to normal. CaMKII phosphorylates AMPA receptors already present in the postsynaptic membrane and/or promotes the insertion of new receptors from a reserve pool. (After Malenka and Nicoll, 1999.)

и убедительные свидетельства по крайней мере частичного пресинаптического механизма проявления ДВП. Одним из таких примеров является группа синапсов, образованных мшистыми волокнами гранулярных клеток зубчатой фасции с пирамидами поля CA3 гиппокампа. В этих синапсах было обнаружено, что ДВП может быть вызвана при блокаде NMDA рецепторов и даже при полном отсутствии постсинаптических ответов[45], что предполагает чисто пресинаптическую природу ДВП. Последующие эксперименты все-таки показали увеличение концентрации постсинаптического кальция в этих нейронах[29]. Оказалось, что и увеличение концентрации кальция, и ДВП зависят от активации метаботропных глутаматных рецепторов (глава 10) и могут быть блокированы ингибиторами цАМФ-зависимой протеинкиназы, что позволяет предположить происхождение увеличенного внутриклеточного кальция из внутриклеточных депо.

Можно предположить, что ДВП в синапсе между мшистыми волокнами и пирамидами поля CA3 все же постсинаптического происхождения, но опосредована метаботропными рецепторами. Однако существует наблюдение, которое не позволяет сделать такой вывод: ДВП в этом синапсе сопровождается ослаблением фасилитации. В большинстве центральных синапсов при нанесении двух пресинаптических стимулов с небольшим интервалом (около 50 мс) постсинаптический ответ на второй стимул существенно облегчается. Механизм этой так называемой фасилитации на парный импульс такой же, как и в нервно-мышечном синапсе, то есть увеличение количества квантов медиатора, высвобождаемых из пресинаптической терминали. Учитывая, что фасилитация уменьшается, когда увеличивается средний квантовый состав (см. рис. 12.2), то уменьшение фасилитации, которое сопровождает ДВП в разбираемом случае, предполагает увеличение квантов, выделяемых из пресинаптической терминали. В любом случае, изменение фасилитации говорит о пресинаптических процессах. Этот критерий был описан как указывающий на пресинаптический механизм ДВП во многих синапсах[46)–49].

Пресинаптическое проявление ДВП в ответ на активацию метаботропных постсинаптических рецепторов предполагает наличие ретроградного посредника в синапсе. Одним из кандидатов в такие посредники является оксид азота (NO), который может быть синтезирован в постсинаптической клетке и быстро диффундирует в окружающую ткань (см. главу 10).

Долговременная депрессия

Долговременная депрессия (ДВД) синаптической передачи, противоположная по знаку ДВП, была впервые показана в синапсах между коллатералями Шаффера и пирамидами поля CA1[50]. ДВД была позже показана в других областях мозга, таких как поле CA3 гиппокампа, зубчатая фасция, различные области новой коры и в мозжечке[51]. **Гомосинаптическая ДВД** представляет собой длительную депрессию синаптической передачи, вызванную предшествующей ритмической активностью этого же входа (рис. 12.10А). ДВП можно вызвать разными последовательностями стимулов, например, длительной низкочастотной (1–5 стимулов/секунду в течение 5–15 минут), низкочастотной стимуляцией парными импульсами, короткой высокочастотной стимуляцией (50–100 ст/с в течение 1–5 с). В коллатералях Шаффера гомосинаптическая ДВД блокируется антагонистами NMDA рецепторов[52, 53], равно как и гиперполяризацией пирамидной клетки и постсинаптической инъекцией хелаторов кальция[48]. Однако в других областях мозга антагонисты NMDA не оказывали эффекта: напротив, все

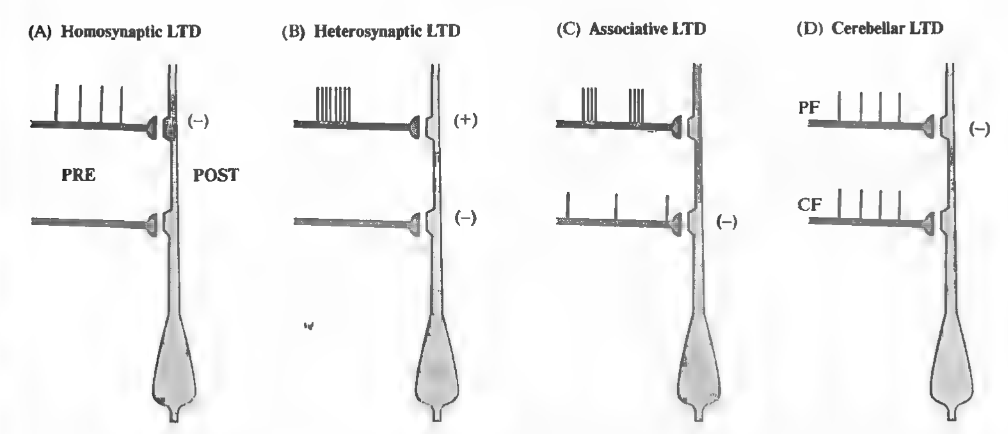


Рис. 12.10. Типы долговременной депрессии, классифицированные в соответствии с условиями стимуляции. Символы отмечают потенциацию (+) или депрессию (—) синаптического ответа после кондиционирующей стимуляции.

Fig. 12.10. Types of Long-Term Depression, classified according to stimulus conditions. Symbols indicate potentiation (+) or depression (—) of the synaptic response after the conditioning stimuli. (A) Homosynaptic LTD is produced by prolonged low-frequency stimulation of the same afferent pathway. (B) Heterosynaptic LTD is produced by tetanic stimulation of a neighboring pathway, which may itself be potentiated after the stimulus train. (C) Associative LTD is produced by low-frequency stimulation of the test pathway, together with brief out-of-phase tetani applied to the conditioning pathway. (D) LTD in the cerebellum is produced by coordinate low-frequency stimulation of the climbing-fiber (CF) and parallel-fiber (PF) inputs to Purkinje cells. (After Linden and Connor, 1995.)

данные указывают на вовлечение метаботропных глутаматных рецепторов[46)].

Гетеросинаптическая ДВД представляет собой длительную депрессию синаптической передачи, вызванную предшествующей активностью в другом афферентном входе этой же клетки (рис. 12.10B). Эта форма ДВД вначале была описана как коррелят гомосинаптической ДВП, вызванной в синапсах коллатералей Шаффера с пирамидами поля CA1[45)]. В этих опытах индукция ДВП в одних входах приводила к депрессии других рядом расположенных входов. Позднее, в хронических отведениях от синапсов между волокнами перфорантного пути и клетками зубчатой фасции было показано, что такая депрессия может длиться несколько дней[54)]. На острых препаратах гетеросинаптическая ДВД длится часы[55)]. Это явление зависит от внеклеточного кальция[56)] и сопровождается повышением концентрации внутриклеточного кальция[57)]. В гиппокампе ДВД зависит от активации NMDA рецепторов[46)], но может быть вызвана постсинаптической деполяризацией без активации NMDA рецепторов[52)]. В зубчатой фасции ДВД блокируется блокаторами кальциевых каналов L-типа[58)].

Ассоциативная ДВД наблюдается при протоколах стимуляции, аналогичных тем, при которых вызывается ассоциативная ДВП. Совпадающая во времени слабая и сильная стимуляция двух входов приводит к ослаблению слабого входа (рис. 12.10C). Существенным отличием ДВД от ДВП является то, что сочетаемые стимулы могут быть не синфазны. Как и при ассоциативной ДВП, деполяризация постсинаптического нейрона может служить заменой синаптической стимуляции[59)]. Оценивая эксперименты на гиппокампе в целом, следует признать, что опубликованные данные по выработке ассоциативной ДВД на гиппокампе противоречивы и во многих случаях применяются специальные сложные протоколы стимуляции — например, предшествующая стимуляция ("priming") стимулами с тэта-частотой (5ст/с)[43)].

ДВД в мозжечке

ДВД убедительно показана в коре мозжечка. Клетки Пуркинье коры мозжечка получают возбуждающий вход от двух источников (глава 22): параллельные волокна, происходящие от клеток-зерен, широко дивергируют и образуют большое количество синапсов на вторичных и третичных дендритах; лиановидные волокна образуют эффективные синапсы на теле и проксимальных дендритах. Передатчиком

в параллельных волокнах служит глутамат, и в их синапсах есть метаботропные и АМРА рецепторы. Передатчик, выделяемый лиановидными волокнами, окончательно не идентифицирован. В мозжечке взрослых животных NMDA рецепторы не обнаружены[46, 60, 61].

Наиболее подробно ДВД в мозжечке была изучена Ито с соавторами[62]. В своих экспериментах эта группа авторов применяла низкочастотную (1–4/с) парную стимуляцию параллельных и лиановидных волокон в течение 5 минут (рис. 12.10D). Последующие ответы на стимуляцию параллельных волокон были ослаблены в течение нескольких часов. Кроме того, когда аппликация глутамата на дендриты сочеталась со стимуляцией лиановидных волокон, последующие ответы на глутамат также были ослаблены, что предполагает опосредование этого эффекта постсинаптической мембраной. Надежной демонстрации ДВД в интактном животном получить не удалось, однако на переживающих срезах и в культуре ткани мозжечка это явление показано убедительно[63, 64].

На этих препаратах было показано, что деполяризация клетки Пуркинье, вызывающая кальциевые потенциалы действия в дендритах (глава 7), может служить заменой стимуляции лиановидного волокна для индукции ДВД[65, 66]. Однако ни стимуляция лиановидного волокна, ни внутриклеточная деполяризация в отдельности не были эффективны для индукции ДВД: всегда была необходима коактивация глутаматных рецепторов, вызванная либо стимуляцией параллельных волокон, либо прямой аппликацией глутамата. В случае стимуляции параллельных волокон ДВД оказалась входоспецифична, то есть ослаблены были только стимулировавшиеся входы. Индукция ДВД предотвращается введением хелаторов кальция в постсинаптическую клетку[67]. Значительное накопление кальция наблюдается после стимуляции лиановидных волокон[68].

Индукция ДВД

Условия возникновения ДВД могут значительно варьировать в зависимости от области мозга. Как следствие этого, оказалось трудно выделить факторы, приводящие к возникновению ДВД. Разные схемы приводятся в разных обзорных статьях[51, 60, 61]. Наиболее постоянным фактором является то, что ДВД, как и ДВП, зависит от постсинаптического накопления кальция. В нейронах гиппокампа кальций входит в основном через NMDA рецепторы, хотя гетеросинаптическая ДВД может быть вызвана только деполяризацией без активации рецепторов и ослабляется блокадой кальциевых каналов L-типа. Это предполагает, что когда локальная деполяризация и вход кальция через NMDA рецепторы вызывает ДВП активированного входа, распространение деполяризации на соседние синаптические области клетки вызывает ДВП через активацию потенциалзависимых кальциевых каналов и вход кальция. В других областях мозга концентрация свободного кальция увеличивалась после активации глутаматом метаботропных глутаматных рецепторов, что приводило к инозитол-3-фосфат-опосредованному выбросу кальция из внутриклеточных депо (глава 10). В клетках Пуркинье мозжечка, в которых отсутствуют NMDA рецепторы, вход кальция опосредован потенциалзависимыми кальциевыми каналами, которые участвуют в генерации дендритных потенциалов действия.

Почему накопление кальция вызывает ДВП в одних случаях и ДВД в других? В настоящее время нет четкого ответа на этот вопрос, хотя есть некоторое различие в достигаемых концентрациях — относительно большая концентрация кальция вызывает ДВП, меньшая концентрация вызывает ДВД. Соответствует этой точке зрения наблюдение на клетках поля CA1: стимул, вызывающий слабую ДВП при нормальной наружной концентрации кальция, вызывает ДВД после уменьшения наружной концентрации[53].

Системы вторичных посредников, опосредующие ДВД

Происходящие в клетке процессы, связывающие сравнительно небольшое увеличение концентрации кальция с ДВД, пока не очень ясны. Как и при ДВП, блокаторы кальмодулина блокируют гомосинаптическую ДВД[69]. Показано, что ДВД отсутствует в нокаутных по гену CaMKII мышах. Кроме того, гомосинаптическая ДВД блокируется постсинаптическим введением блокаторов протеин-фосфатаз.

Индукция ДВД в мозжечке происходит только при одновременной активации метаботропных и АМРА глутаматных рецепторов. Так как активация лиановидных волокон может вызвать значительный вход кальция через потенциалзависимые каналы, трудно предполагать, что основная роль активации метаботропных рецепторов заключается в увели-

чении внутриклеточной концентрации кальция через активацию IP_3-чувствительных депо. Более вероятным представляется путь активации протеин-киназы С (ПКС), что подтверждается данными о блокаде ДВД в мозжечке блокаторами ПКС. Вход ионов натрия через АМРА рецепторы также может играть роль в индукции ДВД, так как замена внеклеточного натрия на литий или цезий также блокирует ДВД[70)].

В нескольких работах на переживающих срезах мозжечка показана роль оксида азота (NO) в индукции и поддержании ДВД, однако в других исследованиях не удалось продемонстрировать роль NO. Оказалось, что NO-синтаза, необходимая для продукции NO, полностью отсутствует в клетках Пуркинье.

Проявление ДВД

Уменьшение постсинаптической чувствительности является основой проявления ДВД. Кроме уже отмеченного ослабления чувствительности к аппликации глутамата, отмечено уменьшение амплитуд миниатюрных ВПСП[71)–73)]. Эти изменения сопровождаются дефосфорилированием GluR1 субъединицы АМРА рецепторов[74)], что подразумевает уменьшение проводимости одиночных каналов. Более того, во время проявления ДВД на клетках гиппокампа в культуре отмечено уменьшение количества АМРА рецепторов на постсинаптической мембране[67)]. Таким образом, механизмы, известные для проявления ДВД, являются обратными механизмам ДВП. Безусловно, обсужденные свойства ДВД подвержены разнообразным модулирующим влияниям.

Кроме того, как и для ДВП, существуют признаки участия пресинаптических механизмов: во многих случаях уменьшение амплитуды синаптического потенциала сопровождается увеличением фасилитации на парный импульс[75, 76)].

Значение изменений синаптической эффективности

Обсужденные в настоящей главе явления представляют собой основу способности нервной системы регулировать синаптическую эффективность в интервалах от десятков миллисекунд до нескольких дней. Как эти механизмы используются при функционировании нервной системы и их относительное значение в основном неизвестны. Наибольший интерес представляют собой два описанных вида потенциации. Пресинаптическая по происхождению ПТП длится десятки минут в цилиарном ганглии и часы в нервно-мышечном соединении позвоночных животных при значительном повышении концентрации ионов кальция в пресинаптической терминали. Такая высокая концентрация легко достижима в небольших пресинаптических бляшках с большим соотношением поверхность/объем. Возможно, что часть несоответствий, возникающих при попытках классифицировать ДВП как пресинаптическое или постсинаптическое явление, связано именно с тем фактом, что в некоторых синапсах может быть значительное временное перекрытие ПТП и ДВП, что не позволяет отделить эти два явления в экспериментах, длящихся всего несколько часов.

Пока нет строгих доказательств участия изменений синаптической эффективности в процессах обучения и памяти, хотя большинство нейробиологов принимает это как исходный постулат, что активизирует исследование механизмов ПТП и ДВП. Интерес усиливается тем, что оба этих явления обладают свойством, постулированным Дональдом Хеббом как необходимым для ассоциативного обучения[77)] — увеличение синаптической эффективности происходит при коактивации пресинаптических и постсинаптических элементов. На современном научном языке синапсы с такими свойствами называют синапсами Хебба.

Достаточно надежно показана корреляция между пространственным обучением и ДВП на нейронах срезов гиппокампа[78)–80)]. Например, оба этих явления могут быть блокированы антагонистами NMDA рецепторов или метаботропных глутаматных рецепторов либо блокаторами кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы. Однако природа поведенческого дефицита, вызванного блокадой, не всегда ясна. Например, при действии антагонистов NMDA рецепторов у крыс наблюдается общие сенсомоторные нарушения, которые влияют на решение задач по ориентации в водном лабиринте (что предполагает нарушение обучения), но крысы легко справляются с задачей, если до начала эксперимента они были ознакомлены с обстановкой проведения обучения[81)]. Таким образом, NMDA-опосредованная ДВП не является необходимым требованием для этой задачи. Сходные

неясности отмечены в экспериментах с удалением генов: некоторые из генов, которые необходимы для ДВП, необходимы для пространственного обучения, некоторые нет[82].

Накопилось много данных, подтверждающих гипотезу о том, что ДВП в миндалине может быть субстратом для аверзивного обуславливания ("fear conditioning"). Получавшие сочетания электрошока и звука крысы демонстрируют усиленный оборонительный рефлекс на звук. Параллельно с этим ответ клеток миндалины на электрическое раздражение внутреннего коленчатого тела (передающего звуковую информацию) увеличен[83, 84]. Соответственно, индукция ДВП в этих же синапсах с помощью электрической стимуляции приводит к увеличению ответов на звуковые стимулы[68]. Оба эффекта блокируются антагонистами NMDA рецепторов[85, 86]. В заключение можно сказать, что хотя безоговорочной связи между ДВП и пространственным обучением не установлено, ДВП может играть роль в более дискретных актах обучения, таких как классическое обуславливание.

Выводы

- Короткие периоды синаптической активации могут приводить к фасилитации, депрессии или усилению выброса медиатора, или к комбинации этих эффектов.
- Фасилитация исчезает за несколько сотен миллисекунд; синаптическая депрессия и усиление длятся несколько секунд.
- Фасилитация связана с длительным увеличением концентрации кальция в цитоплазме пресинаптической терминали.
- Продолжительная ритмическая стимуляция приводит к посттетанической потенциации (ПТП) выброса медиатора, которая может длиться десятки минут и также опосредована увеличением концентрации кальция в пресинаптической терминали.
- Во многих областях нервной системы ритмическая стимуляция может приводить к долговременной потенциации (ДВП) или долговременной депрессии (ДВД) синаптической передачи.
- Изменения синаптической эффективности при ДВП и ДВД могут быть гомосинаптическими, то есть затрагивающими только стимулируемый вход, или гетеросинаптическими, затрагивающими соседние синапсы; гетеросинаптические изменения могут быть ассоциативными, то есть требующими координированной активности синаптических входов.
- Возникновение ДВП связано с повышением концентрации кальция в постсинаптической клетке и обусловлено как встраиванием новых рецепторов в постсинаптическую мембрану, так и увеличением чувствительности рецепторов.
- Возникновение ДВД также связано с повышением концентрации кальция в постсинаптической клетке и обусловлено уменьшением количества и чувствительности рецепторов.
- ДВП и ДВД могут вызывать изменения выброса медиатора из пресинаптической терминали.
- Хотя существуют корреляции между возникновением ДВП и ДВД и изменениями поведения при обучении, причинно-следственной связи между этими длительными изменениями синаптической эффективности и образованием памяти не установлено.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Daniel, H., Levenes, C., and Krepel, F. 1998. Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends Neurosci.* 21: 401–407.
- Linden, D. J., and Conner, J. A. 1995. Long-term synaptic depression. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 319–357.
- Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. 1999. Long-term potentiation—A decade of progress? *Science* 285: 1870–1874.

Статьи

- Barrionuevo, G., and Brown, T. H. 1983. Associative long-term potentiation in hippocampal slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7347–7351.
- Bliss, T. V. P., and Lømo, T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 331–356.

- delCastillo, J., and Katz, B. 1954. Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J. Physiol.* 124: 574–585.
- Ito, M., Sakurai, M., and Tongroach, P. 1982. Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* 324: 113–134.
- Malinow, R., and Tsien, R. W. 1990. Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346: 177–180. [12]
- Mallart, A., and Martin, A. R. 1967. Analysis of facilitation of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.* 193: 679–697.
- Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K., and Malinow, R. 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284: 1811–1816.
- Weinrich, D. 1970. Ionic mechanisms of post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog. *J. Physiol.* 212: 431–446.
- Zengel, J. E., and Magleby, K. L. 1982. Augmentation and facilitation of transmitter release. A quantitative description at the frog neuromuscular junction. *J. Gen. Physiol.* 80: 582–611.

Цитированная литература

1. Mallart, A., and Martin, A. R. 1967. *J. Physiol.* 193: 679–697.
2. del Castillo, J., and Katz, B. 1954. *J. Physiol.* 124: 574–585.
3. Dudel, J., and Kuffler, S. W. 1961. *J. Physiol.* 155: 543–562.
4. Kuno, M. 1964. *J. Physiol.* 175: 100–112.
5. Wernig, A. 1972. *J. Physiol.* 226: 751–759.
6. Mallart, A., and Martin, A. R. 1968. *J. Physiol.* 196: 593–604.
7. Redman, R. S., and Silinsky, E. M. 1994. *J. Physiol.* 477: 117–127.
8. Katz, B., and Miledi, R. 1968. *J. Physiol.* 195: 481–492.
9. Martin, A. R., and Pilar, G. 1964. *J. Physiol.* 175: 16–30.
10. Stewart, R. R., Adams, W. B., and Nicholls, J. G. 1989. *J. Exp. Biol.* 144: 1–12.
11. Parnas, H., Parnas, I., and Segel, L. A. 1990. *Int. Rev. Neurobiol.* 32: 1–50.
12. Magleby, K. L., and Zengel, J. E. 1976. *J. Physiol.* 257: 449–470.
13. Zengel, J. E., and Magleby, K. L. 1982. *J. Gen. Physiol.* 80: 582–611.
14. Rosenthal, J. L. 1969. *J. Physiol.* 203: 121–133.
15. Weinreich, D. 1970. *J. Physiol.* 212: 431–446.
16. Nussinovitch, I., and Rahamimoff, R. 1988. *J. Physiol.* 396: 435–455.
17. Tang, Y.-G., and Zucker, R. S. 1997. *Neuron* 18: 483–491.
18. Bliss, T. V. P., and Lømo, T. 1973. *J. Physiol.* 232: 331–356.
19. Baxter, D. A., Bittner, G. D., and Brown, T. H. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5978–5982.
20. Andersen, P., et al. 1977. *Nature* 266: 736–737.
21. Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. 1999. *Science* 285: 1870–1874.
22. Barrionuevo, G., and Brown, T. H. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7347–7351.
23. Nowak, L., et al. 1984. *Nature* 307: 462–465.
24. Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. 1984. *Nature* 309: 261–263.
25. Takumi, Y., et al. 1999. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868: 474–481.
26. Collingridge, G. L., Kehl, S. J., and McClennan, H. 1983. *J. Physiol.* 334: 33–46.
27. Muller, D., Joly, M., and Lynch, G. 1988. *Science* 242: 1694–1697.
28. Lynch, G., et al. 1983. *Nature* 304: 719–721.
29. Yeckel, M. F., Kapur, A., and Johnston, D. 1999. *Nature Neurosci.* 2: 525–633.
30. Malenka, R. C., et al. 1988. *Science* 242: 81–84.
31. Schulman, H. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 375–381.
32. Malenka, R. C., et al. 1989. *Nature* 340: 554–557.
33. Malinow, R., Schulman, H., and Tsien, R. W. 1989. *Science* 245: 862–866.
34. Silva, A. J., et al. 1992. *Science* 257: 501–506.
35. Malinow, R., and Tsien, R. W. 1990. *Nature* 346: 177–180.
36. Bekkers, J. M., and Stevens, C. F. 1990. *Nature* 346: 724–729.
37. Reid, C. A., and Clements, J. D. 1999. *J. Physiol.* 518 (pt. 1): 121–130.
38. Shi, S. H., et al. 1999. *Science* 284: 1811–1816.
39. Takumi, Y., et al. 1999. *Nature Neurosci.* 2: 618–624.
40. Liao, D., Hessler, N. A., and Malinow, R. 1995. *Nature* 375: 400–404.
41. Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A., and Malenka, R. C. 1995. *Neuron* 15: 427–434.
42. Lledo, P. M., et al. 1998. *Science* 279: 339–403.
43. Engert, F., and Bonhoeffer, T. 1999. *Nature* 399: 66–70.

44. Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. 1999. *Nature Neurosci.* 2: 597–604.
45. Zalutsky, R. A., and Nicoll, R. A. 1990. *Science* 248: 1619–1624.
46. Maren, S., and Fanselow, M. S. 1995. *J. Neurosci.* 15: 7548–7564.
47. Rogan, M. T., and LeDoux, J. E. 1995. *Neuron* 15: 127–136.
48. Castro-Alamancos, M. A., and Calcagnotto, M. E. 1999. *J. Neurosci.* 19: 9090–9097.
49. Voronin, L. L., Rossokhin, A. V., and Sokolov, M. V. 1999. *Neurosci. Behav. Physiol.* 29: 347–354.
50. Lynch, G. S., Dunwiddie, T., and Gribkoff, V. 1977. *Nature* 266: 737–739.
51. Linden, D. J., and Conner, J. A. 1995. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 319–357.
52. Dudek, S. M., and Bear, M. F. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4363–4367.
53. Mulkey, R. M., and Malenka, R. C. 1992. *Neuron* 9: 967–975.
54. Krug, M., et al. 1985. *Brain Res.* 360: 264–272.
55. Colbert, C. M., Burger, B. S., and Levy, W. B. 1992. *Brain Res.* 571: 159–161.
56. Christofi, G., et al. 1993. *J. Neurophysiol.* 69: 219–229.
57. Barry, M. F., et al. 1996. *Hippocampus* 6: 3–8.
58. Christie, B. R., and Abraham, W. C. 1994. *Neurosci. Lett.* 167: 41–45.
59. Debanne, D., and Thompson, S. M. 1996. *Hippocampus* 6: 9–16.
60. Levenes, C., Daniel, H., and Crepel, F. 1998. *Prog. Neurobiol.* 55: 79–91.
61. Daniel, H., Levenes, C., and Krepel, F. 1998. *Trends Neurosci.* 21: 401–407.
62. Ito, M., Sakurai, M., and Tongroach, P. 1982. *J. Physiol.* 324: 113–134.
63. Sakurai, M. 1987. *J. Physiol.* 394: 463–480.
64. Hirano, T. 1990. *Neurosci. Lett.* 119: 141–144.
65. Crepel, F., and Jaillard, D. 1991. *J. Physiol.* 432: 123–141.
66. Hirano, T. 1990. *Neurosci. Lett.* 119: 145–147.
67. Sakurai, M. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3383–3385.
68. Ross, W. N., and Werman, R. 1987. *J. Physiol.* 389: 319–336.
69. Mulkey, R. M., Herron, C. E., and Malenka, R. C. 1993. *Science* 261: 1051–1055.
70. Linden, D. J., Smeyne, M., and Connor, J. A. 1993. *Neuron* 10: 1093–1100.
71. Oliet, S., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. 1996. *Science* 271: 1294–1297.
72. Carrol, R. C., et al. 1999. *Nature Neurosci.* 2: 454–460.
73. Murashima, M., and Hirano, T. 1999. *J. Neurosci.* 19: 7326–7333.
74. Lee, H.-K., et al. 1998. *Neuron* 21: 1151–1162.
75. Berretta, N., and Cherubini, E. 1998. *Eur. J. Neurosci.* 10: 2957–2963.
76. Domenici, M. R., Berretta, N., and Cherubini, E. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8310–8315.
77. Hebb, D. O. 1949. *The Organization of Behavior.* Wiley, New York.
78. Izquierdo, I., and Medina, J. H. 1995. *Neurobioi. Learn. Mem.* 63: 19–32.
79. Martinez, J. L., Jr., and Derrick, B. E. 1996. *Annu. Rev. Psychol.* 47: 173–203.
80. Elgersma, Y., and Silva, A. J. 1999. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 209–213.
81. Cain, D. P. 1998. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22: 181–193.
82. Holscher, C. 1999. *J. Neurosci. Res.* 58: 62–75.
83. Rogan, M. T., Staubil, U. V., and LeDoux, J. E. 1997. *Nature* 390: 604–607.
84. McKernan, M. G., and Shinnick-Gallagher, P. 1997. *Nature* 390: 607–611.
85. Miserendino, M. J., et al. 1990. *Nature* 345: 716–718.
86. Fanselow, M. S., and Kim, J. J. 1994. *Behav. Neurosci.* 108: 210–212.

Глава 13

Клеточная и молекулярная биохимия синаптической передачи

В химических синапсах нейроны высвобождают нейропептиды и низкомолекулярные медиаторы, такие как ацетилхолин. Низкомолекулярные медиаторы синтезируются в аксонных окончаниях (терминалях). Существует целый ряд механизмов, которые обеспечивают хранение медиаторов в синаптических пузырьках (везикулах), быстрое изменение активности ферментов, осуществляющих синтез медиаторов, и долговременные изменения количества молекул этих ферментов в терминалях. Эти механизмы регулируются в соответствии с потребностями клеток высвобождать необходимое количество медиатора. Нейропептиды синтезируются и включаются в пузырьки в теле клетки, затем транспортируются в аксон к месту хранения и высвобождения.

Синаптические пузырьки и другие органеллы переносятся по направлению к терминали (антероградный транспорт) и обратно к телу клетки (ретроградный транспорт) быстрым аксонным транспортом. Медленным аксонным транспортом переносятся цитоплазматические белки и компоненты цитоскелета аксонов от тела клетки к терминали.

Высвобождение медиатора из синаптических пузырьков происходит по механизму экзоцитоза. Экзоцитоз — высококонсервативный процесс, включающий перемещение пузырьков по направлению к мембране и слияние везикулярной и клеточной мембран, как у дрожжей, так и у мух и у человека. В нервных терминалях белки синаптического пузырька связываются с белками пресинаптической мембраны, образуя комплекс, который удерживает пузырек, готовый к выбросу медиатора. Ионы кальция, входящие в терминаль, связываются с белками этого комплекса и способствуют слиянию везикулярной и пресинаптической мембран и экзоцитозу.

Рецепторы нейромедиатора сконцентрированы на мембране постсинаптической клетки непосредственно под нервной терминалью. Белки цитоскелета и мембранные белки удерживают рецептор и создают субмембранную упорядоченную структуру, с которой связано функционирование внутриклеточных сигнальных белков.

Финальный шаг химической синаптической передачи — удаление медиатора из синаптической щели. Низкомолекулярные медиаторы либо распадаются после высвобождения, либо захватываются глиальными клетками или аксонными терминалями, где они переупаковываются в пузырьки и снова выбрасываются в синаптическую щель. Нейропептиды удаляются путем диффузии. Химические вещества, которые оказывают влияние на распад медиатора или его захват, могут оказывать воздействие на процесс передачи сигнала. Это доказывает, что процессы удаления нейромедиатора из синаптической щели играют важную роль в синаптической передаче.

Процесс выяснения биохимических основ синаптической передачи вначале был очень медленным. Через шестьдесят лет после того, как идея химической синаптической передачи была впервые предложена Эллиотом в 1904 году[1)], только три вещества — ацетилхолин, норадреналин и γ-аминомасляная кислота — были безоговорочно идентифицированы как нейромедиаторы. Рецепторы этих медиаторов были просто классифицированы на основании их фармакологических свойств: никотиновые или мускариновые для ацетилхолина, α- или β-адренергические для норадреналина. В последние несколько десятилетий произошел взрыв количества биохимических исследований нервной системы, что стало следствием концептуальных и технологических достижений биохимии и генетики. В результате этого более 50 веществ были предложены в качестве нейротрансмиттеров. Были установлены структура белка и молекулярные механизмы деятельности рецепторов нейромедиа-

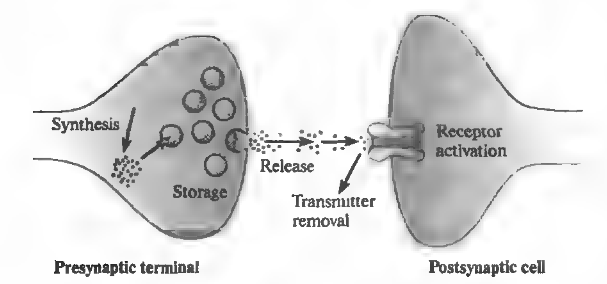


Рис. 13.1. Химическая синаптическая передача. В химических синапсах нейромедиаторы синтезируются, хранятся в синаптических везикулах и высвобождаются путем экзоцитоза. Медиаторы диффундируют через синаптическую щель, активируют рецепторы на постсинаптической клетке и затем удаляются путем диффузии, захвата или распада.

Fig. 13.1. Chemical Synaptic Transmission. At chemical synapses, neurotransmitters are synthesized, stored in synaptic vesicles, and released by exocytosis. Transmitters diffuse across the synaptic cleft, activate receptors on the postsynaptic cell, and then are removed by diffusion, uptake, or degradation.

торов (главы 2 и 3) и охарактеризованы пути, по которым медиаторы осуществляют или модулируют синаптическую передачу (главы 9 и 10).

В этой главе мы сфокусируем внимание на белках и органеллах, которые осуществляют синтез медиаторов, их хранение, высвобождение и удаление из синаптической щели (рис. 13.1). Хотя многие из этих процессов были описаны в нервной ткани, некоторые из них были впервые охарактеризованы в совершенно других условиях. Ярким примером являются белки, участвующие в высвобождении медиатора, функция которых была установлена на основании их роли в процессах транспорта в аппарате Гольджи и секреции в клетках дрожжей.

§ 1. Нейромедиаторы

Идентификация медиаторов

Пионерские эксперименты Лэнгли, Леви, Фельдберга и Дейла установили, что ацетилхолин является нейротрансмиттером в нервно-мышечном соединении скелетной мускулатуры позвоночных и в автономных ганглиях (глава 9). Определяющие работы Кеннона, фон Эйлера и Перта показали, что норадреналин является медиатором, высвобождающимся из симпатических нейронов[2], а Флори, Куффлер, Кравитц и их коллеги открыли, что γ-аминомасляная кислота является тормозным медиатором в нервно-мышечном контакте ракообразных[3]. В этих исследованиях были использованы легко доступные периферические синапсы, в которых возможно избирательно стимулировать пресинаптический аксон, регистрировать внутриклеточную активность постсинаптической клетки, апплицировать химические вещества на пресинаптическую мембрану с помощью микропипетки и собирать высвобождающийся медиатор. Таким образом было показано, что молекула, которая, возможно, является медиатором, была синтезирована пресинаптической клеткой, хранилась в аксонной терминали, выделялась вследствие стимуляции нерва и воспроизводила эффекты эндогенного трансмиттера в физиологических и фармакологических тестах.

В отличие от таких периферических структур, отделы центральной нервной системы содержат разные типы нейронов, которые общаются друг с другом. Это сильно усложняет идентификацию медиаторов. К счастью, клетки, использующие один и тот же трансмиттер, иногда сгруппированы вместе, а их аксоны проходят в виде пучков к хорошо известным отделам. Это дает возможность стимулировать известные популяции аксонов и собирать медиатор, который они выделяют. Такие эксперименты могут быть сделаны на интактной ЦНС с использованием, например, микродиализа[4, 5] или push-pull канюли[6, 7] для перфузии мест скопления синапсов. В других случаях могут быть использованы срезы ткани ЦНС толщиной примерно 100 мкм для того, чтобы стимулировать определенные нервные тракты, осуществляя при этом запись активности постсинаптических клеток. Срезы можно культивировать *in vitro*, на них можно апплицировать медиаторы через микропипетку и собирать перфузат[8] или использовать чрезвычайно чувствительные амперометрические методы[9].

Были разработаны и другие методы идентификации трансмиттеров и визуализации распределения клеток, которые их выделяют, в синапсах ЦНС. Они будут описаны в главе 14. Многие из этих методов основа-

$CH_3-C(=O)-OCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$

Acetylcholine (ACh)

Adenosine 5'-triphosphate (ATP)

AMINO ACIDS

$^+H_3N-CH_2-COO^-$

Glycine

$^+H_3N-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-COO^-$

Glutamic acid

$^+H_3N-CH_2-CH_2-CH_2-COO^-$

γ-Aminobutyric acid (GABA)

BIOGENIC AMINES

Catecholamines

Dopamine

Norepinephrine (NE, noradrenaline)

Epinephrine (adrenaline)

Indoleamine

5-Hydroxytryptamine (5-HT, serotonin)

Imidazole

Histamine

GASES

NO

Nitric oxide

CO

Carbon monoxide

Рис. 13.2. Низкомолекулярные нейромедиаторы.

Fig. 13.2. Low-Molecular-Weight Neurotransmitters.

ны на детекции экспрессии белков, которые осуществляют различные аспекты химической синаптической передачи.

Нейромедиаторы как посредники

Один и тот же нейромедиатор может высвобождаться в разных отделах нервной системы. Точность послания, которое сообщается этим медиатором, определяется конкретными путями, связывающими разные нейроны между собой. Например, выделение ацетилхолина из терминали моторного нерва в мышце gastrocnemius (брюхоногого моллюска) вызывает удлинение ноги, тогда как ацетилхолин,

высвобождаемый в определенных синапсах в ЦНС, дает вам возможность вспомнить картины вашего детства. С другой стороны, нейропептиды обнаружены только в очень малом числе клеток, которые служат для выполнения специфических функций. В таких случаях диффузная аппликация какого-либо нейропептида может вызвать характерное поведение, определяемое распределением и свойствами его рецепторов на центральных нейронах. Например, введение нейропептида Y в спинномозговую жидкость животных приводит к чрезмерному поеданию пищи и ожирению[10].

Молекулы медиаторов

Медиаторы могут быть разделены на три группы. Одна группа содержит так называемые «классические» нейромедиаторы, вещества с низким молекулярным весом, которые хранятся в везикулах в нервных терминалях. Эта группа включает ацетилхолин, норадреналин, адреналин, дофамин, 5-гидрокситриптамин (5-НТ или серотонин), гистамин, аденозинтрифосфат (АТФ) и аминокислоты — γ-аминомасляную кислоту (ГАМК), глутамат и глицин (рис. 13.2). Вторая группа медиаторов, хранящихся в пузырьках, состоит из нейропептилов (табл. 13.1), более 40 из которых были обнаружены в ЦНС млекопитающих. Оксид азота (NO) и оксид углерода (CO) составляют третью группу трансмиттеров, которые являются газами, легко растворимыми в липидах и воде. Следовательно, они не могут храниться в клетках. Очень вероятно, что еще большее число медиаторных веществ остается неисследованным.

Многие вещества, которые были исходно охарактеризованы как нейромедиаторы в нервной системе беспозвоночных или в периферических синапсах нервной системы позвоночных, действуют и в ЦНС млекопитающих. Интересно, что одни и те же медиаторы широко распространены в царстве животных от пиявок и насекомых до миног и млекопитающих.

§ 2. Синтез нейромедиаторов

Где синтезируются молекулы медиатора и как происходит поддержание и пополнение его запасов? Транспортируются ли они в нервное окончание в готовом виде, или медиатор образуется непосредственно в терминали из предшественников, которые доставляются из тела клетки? Ответы на каждый из этих вопросов различны для разных медиаторов. Классические низкомолекулярные медиаторы продуцируются в аксонной терминали из общих клеточных метаболитов и включаются в маленькие синаптические пузырьки (50 нм в диаметре) для хранения и высвобождения. NO и CO также синтезируются в терминали. Поскольку они не могут быть упакованы в пузырьки, NO и CO сразу же диффундируют из нервного окончания и оказывают воздействие на мишени (глава 10). С другой стороны, пептидные нейромедиаторы синтезируются в теле клетки, упаковываются в большие везикулы с плотным центром (large dense-core vesicles, 100–200 нм в диаметре) и транспортируются в аксон.

Дополнительную сложность представляет то, что многие, а возможно и все, нейроны высвобождают более одного медиатора. Обычно это один низкомолекулярный трансмиттер и один или более нейропептид[11, 12]. Рис. 13.3 показывает локализацию 5-НТ и нейропептидов FLRFамида и аллатостатина в отдельных нейронах ЦНС бабочки[13]. Было установлено, что во многих синапсах такие котрансмиттеры действуют синергично (глава 16)[11, 14]. Для выброса низкомолекулярных медиаторов достаточно одиночных импульсов, тогда как для высвобождения нейропептидных котрансмиттеров часто требуются пачки импульсов.

Имеются многочисленные доказательства того, что многие нейроны высвобождают более одного низкомолекулярного медиатора. Эту идею высмеивали всего лишь несколько лет назад. Например, некоторые спинальные интернейроны высвобождают аминокислоту глицин и ГАМК, каждая из которых оказывает тормозное влияние на одну и ту же постсинаптическую клетку через свои собственные рецепторы[15]. Другие спинальные нейроны выбрасывают одновременно АТФ как возбуждающий медиатор и ГАМК как тормозной медиатор[16]. Примечательно то, что многие так называемые моноаминергические нейроны в центральной нервной системе позвоночных (те, которые содержат дофамин, серотонин или норадреналин) содержат также глутаминазу — фермент, который обычно осуществляет синтез глутамата в аксонных терминалях, высвобождающих глутамат (см. обсуждение ниже в этой главе). Эти данные свидетельствуют о том, что такие нейроны высвобождают оба медиатора[17, 18]. Например, нейроны

Таблица 13.1. Нейропептиды в нервной системе млекопитающих.

Table 13.1. Neuropeptides in mammalian nervous systems

Family	Precursor	Neuropeptide
Opioid	Pro-opiomelanocortin (POMC)	Corticotropin (ACTH)
		β-Lipotropin
		α-MSH
		α-Endorphin
		β-Endorphin
		γ-Endorphin
	Pro-enkephalin	Met-enkephalin
		Leu-enkephalin
	Prodynorphin	α-Neoendorphin
		β-Neoendorphin
		Dynorphin A
		Dynorphin B (rimorphin)
		Leumorphin
Neurohypophyseal	Provasopressin	Vasopressin
		Neurophysin II
	Pro-oxytocin	Oxytocin
		Neurophysin I
Tachykinins	α-Protachykinin A	Substance P
	β-Protachykinin A	Substance P
		Neurokinin A
		Neuropeptide K
	γ-Protachykinin A	Substance P
		Neurokinin A
		Neuropeptide γ
	Protachykinin B	Neurokinin B
Bombesin/GRP	Probombesin	Bombesin
	Pro GRP	Gastrin releasing peptide (GRP)
Secretins	—	Secretin
	—	Motilin
	Proglucagon	Glucagon
	Pro VIP	Vasoactive intestinal peptide (VIP)
	Pro GRF	Growth hormone–releasing factor (GRF)
Insulins	Pro-insulin	Insulin
	—	Insulin-like growth factors
Somatostatins	Prosomatostatin	Somatostatin
Gastrins	Progastrin	Gastrin
	Procholecystokinin	Cholecystokinin (CCK)
Neuropeptide Y	Pro NPY	Neuropeptide Y (NPY)
	Pro PP	Pancreatic polypeptide (PP)
	Pro PYY	Peptide YY (PYY)
Other	Pro CRF	Corticotropin-releasing factor (CRF)
	Procalcitonin	Calcitonin
	Pro CGRP	Calcitonin gene-related peptide (CGRP)
	Proangiotensin	Angiotensin
	Probradykinin	Bradykinin
	Pro TRH	Thyrotropin-releasing hormone (TRH)
	—	Neurotensin
	—	Galanin
		Luteinizing hormone–releasing hormone

Рис. 13.3. (См. цветную вклейку после с. 640.) 5-Гидрокситриптамин, FLRFамид и аллатостатин в отдельных нервных клетках бабочки, *Manduca*. (A, C) Флуоресцентные конфокальные микрофотографии срезов оптической доли бабочки, окрашенных антисывороткой к 5-HT (красный) и нейропептиду FLRFамиду (зеленый). (A) Продольный срез. Клетки кластера OL2 (слева внизу) проецируются главным образом в слой ламина (La). (C) Фронтальный вид кластера клеток. Большинство клеток содержат и 5-HT, и FLRFамид и выглядят желтыми. (B, D) Микрофотографии срезов, окрашенных антисывороткой к 5-HT (красный) и нейропептиду аллатостатину (зеленый). (B) Продольный срез. Клетки, содержащие 5-HT и/или аллатостатин, проецируются в ламину, медуллу (M), лобулу (L) и пластинку лобулы (LP). (D) Фронтальный вид кластера клеток

Fig. 13.3. Hydroxytryptamine, FLRFamide, and Allatostatin in Individual Nerve Cells of the moth, Manduca. (A, C) Fluorescence confocal micrographs of a section of the moth optic lobe labeled with antisera to 5-HT (red) and to the neuropeptide FLRFamide (green). (A) Longitudinal section. Cells in the OL2 cluster (lower left) project mostly to the lamina (La). (C) Frontal view of cell cluster. Most cells contain both 5-HT and FLRFamide, and so appear yellow. (B, D) Micrographs of a section labeled with antisera to 5-HT (red) and to the neuropeptide allatostatin (green). (B) Longitudinal section. Cells containing 5-HT and/or allatostatin project to the lamina, the medulla (M), the lobula (L), and the lobula plate (LP). (D) Frontal view of cell cluster. Colocalization of 5-HT and allatostatin occurs in a small subpopulation of cells. (Micrographs kindly provided by N. T. Davis and J. G. Hildebrand.)

ядер шва высвобождают и серотонин, и глутамат из одних и тех же синапсов, которые содержат два разных типа везикул в терминалях. Дофамин-содержащие нейроны среднего мозга имеют два разных типа терминалей. Одни содержат и глутамат, который вызывает быстрый возбуждающий постсинаптический потенциал на клетке-мишени, и дофамин, который распространяется по большей площади, оказывая медленное модулирующее действие. Другие содержат только глутамат.

Синтез ацетилхолина (АХ)

Одно из первых полных исследований о том, как медиаторы аккумулируются в нервных терминалях и как запас медиаторов пополняется в периоды активности клетки, было выполнено Бирксом и МакИнтошем в работе, где они изучали ацетилхолин в терминалях преганглионарных аксонов переднего шейного ганглия кошки (рис. 13.4А и В; см. также главу 16)[19]. Они вставляли канюли в сонную артерию и яремную вену, перфузировали ганглий раствором, содержавшим антихолинэстеразу, и анализировали содержание ацетилхолина в перфузате. В условиях покоя небольшое количество ацетилхолина постоянно высвобождалось из ганглия, составляя примерно 0,1 % от общего содержания ацетилхолина каждую минуту (рис. 13.4С). Тот факт, что уровень ацетилхолина в ганглии оставался неизменным, означал, что ацетилхолин постоянно синтезировался в покое. (Впоследствии было показано, что скорость синтеза ацетилхолина в покое, измеренная по скорости включения радиоактивно меченого холина в ацетилхолин, настолько высока, что количество, равное полному запасу ацетилхолина, распадается и ресинтезируется в аксонной терминали каждые 20 мин[20].)

Затем Биркс и МакИнтош стимулировали преганглионарный нерв длинными пачками импульсов и обнаружили, что количество ацетилхолина, которое высвобождалось из ганглия, увеличивалось в 100 раз. Этот прирост означал, что 10 % исходного содержания ацетилхолина выбрасывалось каждую минуту (см. рис. 13.4С). Интересно, что скорость выброса поддерживалась на одном уровне в течение одного часа без изменения содержания ацетилхолина в ганглии. Таким образом, в течение часовой стимуляции аксонная терминаль могла высвобождать количество ацетилхолина, многократно превышающее исходное содержание медиатора в ганглии без истощения его запаса.

Единственный экзогенный ингредиент, необходимый нервным окончаниям для поддержания запаса ацетилхолина в таких условиях, — это холин, который захватывается из окружающей жидкости по механизмам активного транспорта (рис. 13.5). Необходимость внеклеточного холина была продемонстрирована в экспериментах с перфузией препаратов растворами, не содержащими холин, и блокадой захвата холина аксонным окончанием с помощью гемихолина (НС–3). В обоих случаях уровень ацетилхолина в ганглии и количество ацетилхолина, высвобожденного в результате стимуляции, быстро снижались (рис. 13.4С).

Как же контролируется синтез ацетилхолина, чтобы он мог высвобождаться по первому требованию? Наше понимание механизмов, регулирующих синтез ацетилхолина и его хранение в холинергических нервных окончаниях, на удивление ограничено. Фер-

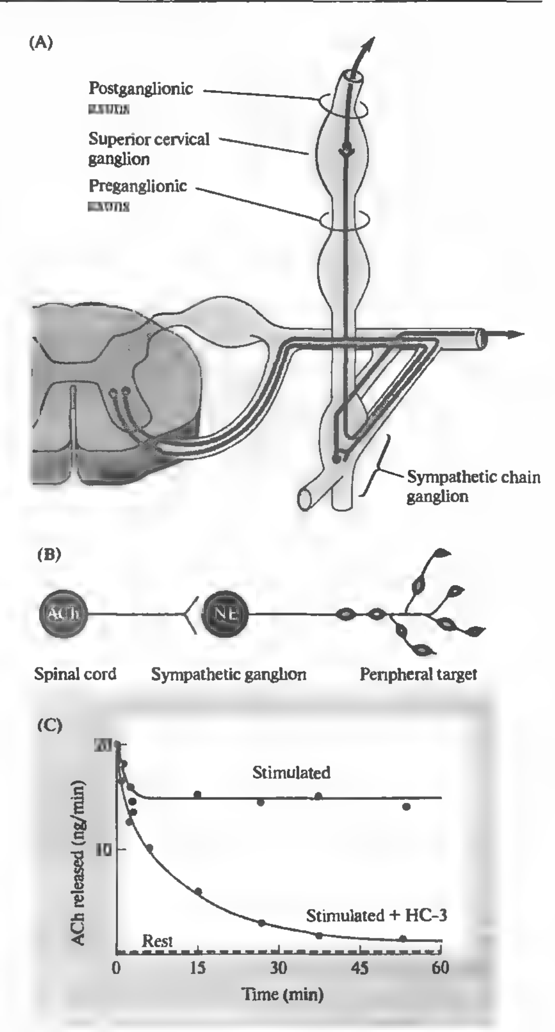


Рис. 13.4. Измерение высвобождения АХ из терминалей преганглионарных аксонов переднего шейного ганглия кошки. (А) Преганглионарные аксоны приходят к переднему шейному ганглию от расположенного позади ганглия симпатического ствола. (В) Преганглионарные нейроны, тела которых лежат в спинном мозге, высвобождают ацетилхолин как медиатор в синапсах симпатических ганглиев. Клетки ганглиев высвобождают норадреналин (NE) из варикозных расширений, расположенных вдоль их отростков на периферии. (С) Высвобождение АХ из симпатического ганглия, перфузированного оксигенированной плазмой, содержащей $3 \cdot 10^{-5}$ М эзерина для ингибирования ацетилхолинэстеразы.

Fig. 13.4. Measuring the Release of ACh from the terminals of preganglionic axons in the cat superior cervical ganglion. (A) Preganglionic axons reach the superior cervical ganglion from more posterior ganglia in the sympathetic chain. (B) Preganglionic neurons, whose cell bodies lie in the spinal cord, release acetylcholine as a transmitter at synapses in sympathetic ganglia. Ganglion cells release norepinephrine (NE) from varicosities along their processes in the periphery. (C) Release of ACh from a cat sympathetic ganglion perfused with oxygenated plasma containing $3 \cdot 10^{-5}$ *M* eserine to inhibit acetylcholinesterase. In control medium, preganglionic stimulation at 20/s causes a sustained, 100-fold increase in the rate of ACh release, compared to release at rest. Release decreases rapidly during stimulation in the presence of $2 \cdot 10^{-5}$ *M* hemicholinium (HC-3), which blocks choline uptake. (After Birks and MacIntosh, 1961.)

ментативные реакции этих процессов суммарно изображены на рис. 13.5 и детально показаны в приложении В. Ацетилхолин синтезируется из холина и ацетил CoA (ацетил-кофермента А) ферментом холинацетилтрансферазой и гидролизуется до холина и ацетата ацетилхолинэстеразой. Оба указанных фермента находятся в цитозоле. Поскольку реакция, катализируемая холинацетилтрансферазой, является обратимой, единственным фактором, контролирующим уровень ацетилхолина, служит **закон действующих масс**. Например, снижение концентрации ацетилхолина, вызванное его высвобождением, будет способствовать синтезу до тех пор, пока равновесие не будет восстановлено. Однако регуляторные механизмы, работающие в холинергических нервных окончаниях, являются более сложными, чем этот. Так, в условиях покоя накопление ацетилхолина ограничено одновременным гидролизом, который осуществляется внутриклеточной ацетилхолинэстеразой; ингибирование ацетилхолинэстеразы в нервном окончании вызывает повышение содержания ацетилхолина[19, 20]. Таким образом, уровень, до которого накапливается ацетилхолин, представляет собой динамическое равновесие между текущим синтезом и распадом. Это является общей чертой метаболизма низкомолекулярных медиаторов. Хотя это и кажется расточительством, такой постоянный круговорот может быть неизбеж-

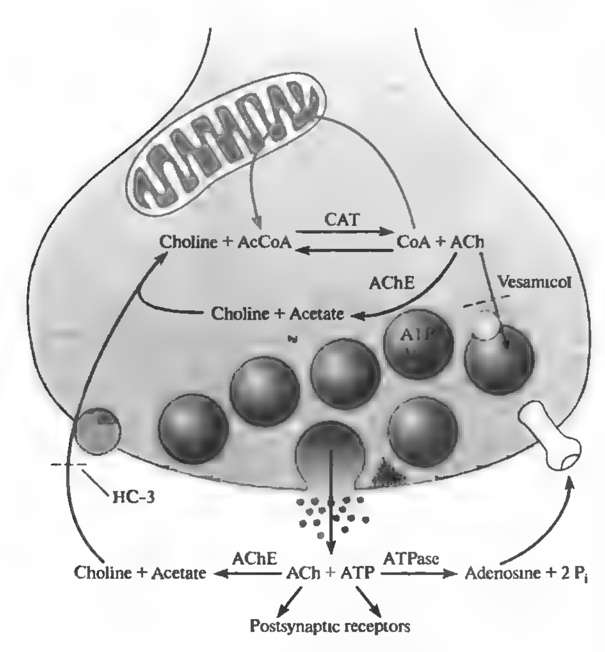


Рис. 13.5. Механизмы синтеза, хранения, высвобождения и распада ацетилхолина. Ацетилхолин синтезируется из холина и ацетил-кофермента А (AcCoA) с помощью фермента холинацетилтрансферазы (CAT) и разрушается ферментом ацетилхолинэстеразой (AChE). AcCoA исходно образуется в митохондриях; холин доставляется в клетку системой высокоаффинного активного транспорта, которая может ингибироваться гемихолином (HC–3). Ach упаковывается в пузырьки вместе с АТФ (ATP) для последующего высвобождения путем экзоцитоза. Транспорт Ach в пузырьки блокируется везамиколом. Везикулярный Ach защищен от разрушения. После высвобождения Ach расщепляется экстраклеточной AChE до холина и ацетата. Около половины холина, поступающего в холинергическую аксонную терминаль, имеет источником гидролиз ранее высвобожденного Ach. В некоторых синапсах АТФ соединяется с постсинаптическими рецепторами. АТФ гидролизуется экстраклеточными АТФазами до аденозина и фосфата (P_i); аденозин может соединяться с пресинаптическими рецепторами, модулируя высвобождение.

Fig. 13.5. Pathways of Acetylcholine Synthesis, Storage, Release, and Degradation. Acetylcholine is synthesized from choline and acetyl coenzyme A (AcCoA) by choline acetyltransferase (CAT) and is degraded by acetylcholinesterase (AChE). AcCoA is synthesized primarily in mitochondria; choline is supplied by a high-affinity active transport system that can be inhibited by hemicholinium (HC–3). ACh is packaged into vesicles together with ATP for release by exocytosis. Transport of ACh into vesicles is blocked by vesamicol. Vesicular ACh is protected from degradation. After release, ACh is degraded by extracellular AChE to choline and acetate. About half of the choline transported into cholinergic axon terminals comes from the hydrolysis of ACh that has been released. At some synapses, ATP combines with postsynaptic receptors. ATP is hydrolyzed by extracellular ATPases to adenosine and phosphate (P_i); adenosine can combine with presynaptic receptors to modulate release.

ным последствием механизмов, которые гарантируют наличие всегда доступного необходимого количества медиатора.

Большая часть АХ в нервных окончаниях перераспределяется в синаптические пузырьки, тогда как синтез и деградация АХ происходят в цитозоле. Тогда для того, чтобы оказать влияние на уровень синтеза, высвобождение ацетилхолина должно снизить концентрацию АХ в цитоплазме. Этот процесс осуществляется путем перемещения цитоплазматического АХ в новообразованные пузырьки. Сходные взаимоотношения между цитоплазматическим синтезом и везикулярным хранением и высвобождением являются общей чертой метаболизма низкомолекулярных медиаторов.

В холинергических нервных окончаниях центральной нервной системы доступность холина, доступность субстрата ацетил CoA (производится в митохондриях) и активность холинацетилтрансферазы, как было показано, регулируют скорость синтеза ацетилхолина[21, 22].

Синтез дофамина и норадреналина

Другой механизм, контролирующий синтез веществ в клетке, — это механизм **отрицательной обратной связи**, согласно которому скорость биосинтеза тормозится при увеличении конечного продукта реакции. Хороший пример этого приводится в работах фон Эйлера, Аксельрода, Уденфренда и их коллег по исследованию синтеза, хранения и высвобождения норадреналина в симпатических нейронах и секреторных клетках надпочечников[23]. Клетки надпочечников сходны с симпатическими нейронами по многим параметрам: они имеют одинаковое эмбриональное происхождение, они иннервированы холинергическими волокнами, приходящими из центральной нервной системы, и они высвобождают катехоламины в ответ на стимуляцию. (Термин **катехоламины** используется для обозначения

группы таких веществ, как ДОФА, дофамин, норадреналин и адреналин, которые содержат катехольное ядро — бензольное кольцо с двумя присоединенными гидроксильными группами — и аминогруппу.) Симпатические нейроны млекопитающих высвобождают норадреналин (те же нейроны у лягушки высвобождают адреналин); клетки надпочечника выделяют и адреналин, и норадреналин.

Норадреналин синтезируется из общего клеточного метаболита тирозина в серии реакций, состоящей из трех шагов: тирозин превращается в ДОФА ферментом тирозингидроксилазой, из ДОФА образуется дофамин под действием фермента декарбоксилазы ароматических L-аминокислот, дофамин превращается в норадреналин под действием дофамин-β-гидроксилазы (рис. 13.6). Превращение тирозина в ДОФА и ДОФА в дофамин происходит в цитоплазме. Затем дофамин транспортируется в синаптические пузырьки, где он превращается в норадреналин дофамин-β-гидроксилазой, связанной с мембраной везикул. Большая часть норадреналина хранится внутри везикул; некоторое количество норадреналина проникает обратно в цитоплазму, где подвергается распаду под действием моноаминоксидазы.

Нейроны, которые выделяют дофамин как медиатор, содержат тирозингидроксилазу и декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, но в этих нейронах отсутствует дофамин-β-гидроксилаза. Другие нейроны, так же как и клетки надпочечников, высвобождают адреналин, который образуется из норадреналина под действием фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы.

Обычно первый фермент такого многоступенчатого процесса является фактором, лимитирующим скорость процесса, и ингибируется конечным продуктом реакции. В экстрактах надпочечника активность тирозингидроксилазы на два порядка ниже, чем декарбоксилазы ароматических L-аминокислот и дофамин-β-гидроксилазы, что дает основания предполагать, что гидроксилирование тирозина является этапом, лимитирующим скорость всего процесса. Более того, было установлено, что тирозингидроксилаза ингибируется норадреналином (а также дофамином и адреналином). Таким образом, по мере накопления дофамина, норадреналина или адреналина дальнейший их синтез будет тормозиться до тех пор, пока не будет достигнуто состояние равновесия, при котором скорость синтеза станет равной скорости распада и высвобождения (рис. 13.6).

Доказательства того, что ингибирование по принципу обратной связи регулирует синтез норадреналина в нейронах, были получены в экспериментах Вейнера с коллегами на терминалях симпатических аксонов, иннервирующих гладкие мышцы сосудистого русла (vas deferens)[24]. Эти авторы измерили скорость синтеза норадреналина в терминалях, инкубируя препараты с радиоактивно меченым предшественником и наблюдая за накоплением радиоактивного норадреналина. Они обнаружили, что скорость синтеза норадреналина была более чем в три раза выше, если в качестве предшественника для первой ферментативной реакции каскада использовали ДОФА вместо тирозина. Эти данные подтвердили, что превращение тирозина в ДОФА лимитирует скорость биосинтеза.

Для того чтобы доказать, что лимитирующий скорость этап контролируется по принципу отрицательной обратной связи, Вейнер с коллегами изменяли концентрацию норадреналина в цитоплазме двумя способами. Во-первых, воспользовавшись тем фактом, что терминали симпатических аксонов имеют специфический механизм транспорта для НА, они добавляли НА в инкубационную жидкость, что вызывало увеличение концентрации НА в терминалях. Это снижало скорость синтеза норадреналина из тирозина. Напротив, стимуляция нерва, которая уменьшала концентрацию НА в цитоплазме, повышала скорость превращения тирозина в НА почти в два раза. Такого увеличения скорости синтеза не наблюдалось, однако, если НА добавляли в инкубационную среду во время стимуляции нерва. По-видимому, захват НА из среды был достаточен для поддержания определенного уровня норадреналина в аксонных терминалях и, таким образом, лимитировал его биосинтез.

Дополнительные факторы оказывают влияние на синтез катехоламинов (рис. 13.7). При высвобождении норадреналина из аксонных терминалей, вызванном стимуляцией нерва, тирозингидроксилаза приобретает большее сродство к кофактору тетрагидробиоптерину и становится менее чувствительной к ингибированию НА[25]. Эти изменения связаны с обратимым фосфорилированием тирозингидроксилазы киназами, которые активируются входящими в клетку иона-

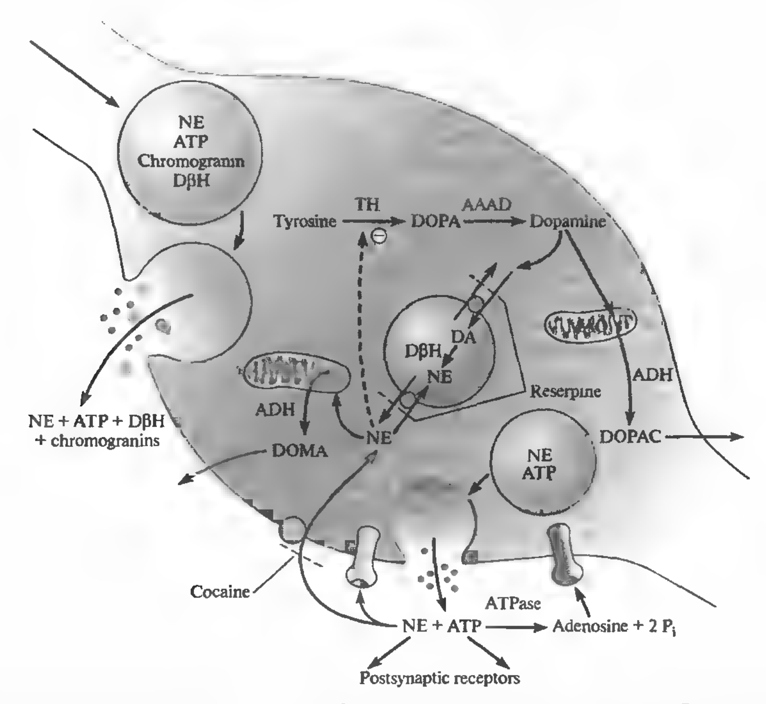


Рис. 13.6. Механизмы синтеза, хранения, высвобождения и распада норадреналина. Тирозин превращается в ДОФА с помощью фермента тирозингидроксилазы (TH). ДОФА преобразуется в дофамин декарбоксилазой ароматических L-аминокислот (AAAD). Дофамин транспортируется в пузырьки, где из него образуется норадреналин при помощи фермента дофамин-β-гидроксилазы (DβH). Норадреналин ингибирует TH, регулируя таким образом синтез по принципу отрицательной обратной связи. Транспорт дофамина и норадреналина в пузырьки блокируется резерпином. Пузырьки также содержат АТФ (крупные плотные пузырьки также содержат растворимую DβH и хромогранины). Все растворимые компоненты везикул выбрасываются вместе. NE, АТФ, аденозин и пептиды, производные хромогранинов, могут связываться с пре- или постсинаптическими рецепторами. После высвобождения норадреналин возвращается обратно в варикозные расширения с помощью механизма захвата, который блокируется кокаином. Норадреналин в цитоплазме может быть вновь упакован в пузырьки для последующего высвобождения. В варикозных расширениях моноаминоксидаза (MAO) и альдегиддегидрогеназа (ADH) расщепляют норадреналин до 3,4-дигидроксиминдальной кислоты (DOMA) и дофамин до 3,4-дигидрофенилуксусной кислоты (DOPAC).

Fig. 13.6. Pathways of Norepinephrine Synthesis, Storage, Release, and Uptake. Tyrosine is converted to DOPA by tyrosine hydroxylase (TH). DOPA is converted to dopamine (DA) by aromatic L-amino acid decarboxylase (AAAD). Dopamine is transported into vesicles, where it is converted to norepinephrine (NE) by dopamine β-hydroxylase (DβH). Norepinephrine inhibits TH, thus regulating synthesis by feedback inhibition. Transport of dopamine and norepinephrine into vesicles is blocked by reserpine. Vesicles also contain ATP (large dense-core vesicles contain soluble DβH and chromogranins as well). All soluble components of vesicles are released together. NE, ATP, adenosine, and peptides derived from chromogranins can bind to pre- or postsynaptic receptors. After release, norepinephrine is transported back into the varicosity by an uptake mechanism that is blocked by cocaine. Norepinephrine in the cytoplasm can be repackaged into vesicles for release. Within the varicosity, monoamine oxidase (MAO) and aldehyde dehydrogenase (ADH) degrade norepinephrine to 3,4-dihydroxymandelic acid (DOMA) and dopamine to 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC).

ми кальция[26, 27]. Еще одним фактором, регулирующим активность тирозингидроксилазы, является концентрация тетрагидробиоптерина, который синтезируется из гуанозинтрифосфата[28]. Итак, различные механизмы действуют в клетке для того, чтобы скорость синтеза норадреналина обеспечивала клетку необходимым количеством медиатора.

Синтез 5-НТ

Серотонин синтезируется из триптофана. Первая стадия этого процесса — превращение

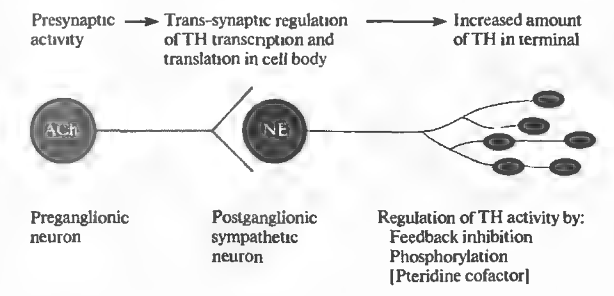


Рис. 13.7. Регуляция тирозингидроксилазы в симпатических нейронах. Активность пресинаптического нейрона влияет на экспрессию тирозингидроксилазы (TH) в постсинаптической клетке. Этот процесс, известный как транс-синаптическая регуляция, определяет количество TH, присутствующего в клетке и нервном окончании. В нервной терминали существует локальный контроль активности тирозингидроксилазы.

Fig. 13.7. Regulation of Tyrosine Hydroxylase in sympathetic neurons. The expression of tyrosine hydroxylase (TH) is influenced by the activity of the presynaptic neuron, a process referred to as trans-synaptic regulation. This determines the amount of TH present in the cell and nerve terminal. Within nerve terminals, there is local control of tyrosine hydroxylase activity.

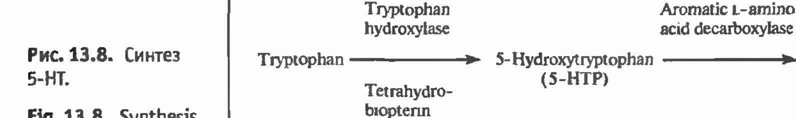


Рис. 13.8. Синтез 5-HT.

Fig. 13.8. Synthesis of 5-HT.

триптофана в 5-гидрокситриптофан (5-HTP) с помощью фермента триптофангидроксилазы — является лимитирующей (рис. 13.8)[29]. 5-HTP декарбоксилируется с образованием серотонина (5-HT) при участии декарбоксилазы ароматических L-аминокислот, т. е. того же самого фермента, который превращает ДОФА в дофамин. Высвобождение 5-HT из нейронов во время стимуляции вызывает повышение скорости превращения триптофана в 5-гидрокситриптофан. Предполагается, что это происходит благодаря изменению свойств триптофангидроксилазы, вызванному кальций-зависимым фосфорилированием[30], сходным с эффектами стимуляции тирозингидроксилазы. Как и в случае тирозингидроксилазы, для функционирования триптофангидроксилазы необходим кофактор тетрагидробиоптерин. Доступность этого кофактора будет регулировать синтез серотонина.

Нейроны не могут синтезировать триптофан. Поэтому первым шагом, ведущим к началу синтеза 5-HT, является облегченный транспорт триптофана из крови в спинномозговую жидкость (глава 8). Другие нейтральные аминокислоты (фенилаланин, лейцин и метионин) транспортируются из крови в мозг теми же переносчиками, что и триптофан. Таким образом, важным фактором, определяющим уровень 5-HT в серотонинергических нейронах, является относительное в сравнении с другими нейтральными аминокислотами количество триптофана в пище. В результате поведение, связанное с функцией 5-HT (глава 14), особенно чувствительно к составу диеты[31]. Например, добровольцы, которых кормили пищей с низким содержанием белка в течение одного дня, а затем давали смесь аминокислот, не содержавшую триптофана, демонстрировали агрессивное поведение[32] и изменение цикла сна[33].

Синтез ГАМК

ГАМК синтезируется из глутамата ферментом глутаматдекарбоксилазой (GAD). Эта реакция была впервые охарактеризована как часть так называемого ГАМК-шунта, т. е. серии реакций, в ходе которой α-кетоглутарат может быть преобразован в сукцинат (рис. 13.9). ГАМК-шунт впервые был описан в качестве специфичного для мозга пути метаболизма глюкозы, который позволяет миновать часть реакций цикла Кребса (отсюда термин «шунт»). Данные о том, что ГАМК является основным тормозным медиатором в мозге[34], вместе с данными о том, что глутаматдекарбоксилаза обнаружена только в нейронах, высвобождающих ГАМК, говорят о том, что главная функция ГАМК-шунта не связана с метаболизмом глюкозы.

Кравитц с коллегами показали, что в тормозных нейронах коры физиологические уровни ГАМК ингибируют глутаматдекарбокси-

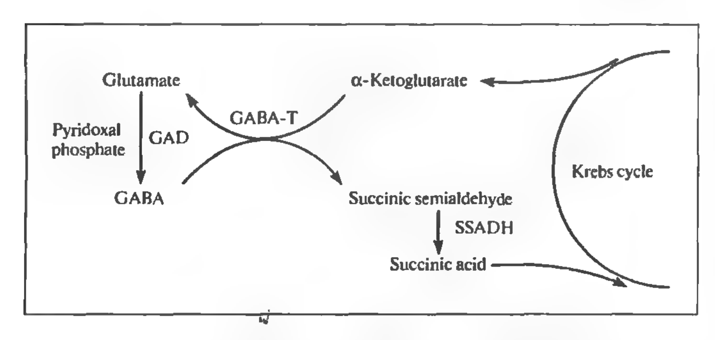


Рис. 13.9. Синтез и метаболизм ГАМК. ГАМК синтезируется из глутамата с помощью фермента глутаматдекарбоксилазы (GAD), которой необходим пиридоксальфосфат в качестве кофактора. Глутамат образуется из α-кетоглутарата при участии фермента ГАМК-α-оксоглутараттрансаминазы (GABA-T). ГАМК расщепляется до янтарной кислоты GABA-T и сукцинат-полуальдегиддегидрогеназой (SSADH).

Fig. 13.9. GABA Synthesis and Metabolism. GABA is synthesized from glutamate by the enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD), which requires pyridoxal phosphate as a cofactor. Glutamate is synthesized from α-ketoglutarate by the enzyme GABA α-oxoglutarate transaminase (GABA-T) or from glutamine (see Figure 13.10). GABA is metabolized to succinic acid by GABA-T and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH).

лазу, свидетельствуя о том, что отрицательная обратная связь регулирует накопление ГАМК[35]. В мозге млекопитающих были найдены несколько дополнительных регуляторов синтеза ГАМК, включая АТФ, неорганический фосфат и кофактор пиридоксальфосфат[36]. В мозге присутствуют две формы глутаматдекарбоксилазы[37]. GAD_{67} имеет высокое сродство к пиридоксальфосфату, и поэтому может быть активированной постоянно; GAD_{65} имеет низкое сродство к пиридоксальфосфату, и ее активность может быстро регулироваться доступностью этого кофактора. Мутантные мыши, у которых отсутствует GAD_{65}, имеют нормальное поведение и нормальные уровни ГАМК, но они чуть более чувствительны к судорогам. Мыши, нокаутированные по гену GAD_{67}, демонстрируют значительное снижение уровня ГАМК в мозге и умирают вскоре после рождения от сильного расщепления неба[38].

Синтез глутамата

Глутамат является основным возбуждающим медиатором в мозге. В клетках существует несколько путей синтеза глутамата. В нейронах глутамат, который используется в качестве нейромедиатора, первоначально образуется из глутамина при помощи активируемой фосфатом формы фермента глутаминазы (рис. 13.10)[39]. Специфичный для мозга транспортер неорганического фосфата локализован избирательно на терминалях глутаматергических нейронов и, таким образом, может регулировать синтез глутамата[40]. Большая часть глутамата, высвобождаемого нейронами, захватывается глиальными клетками и превращается в этих клетках в глутамин. Глутамин, в свою очередь высвобождающийся из глиальных клеток, захватывается нейронами и снова превращается в глутамат.

Кратко- и долговременная регуляция синтеза медиаторов

Описанные выше регуляторные механизмы работают быстро, изменяя скорость синтеза в нервных окончаниях. Кроме таких кратковременных эффектов существуют механизмы долговременной регуляции. Прекрасным примером такой регуляции является ответ симпатической нервной системы у животных, подвергнутых продолжительному стрессу. При действии стресса на организм активируются симпатические нейроны. Продолжительная активация ведет к трех-, четырехкратному увеличению уровней тирозингидроксилазы и дофамин-β-гидроксилазы в телах и терминалях симпатических нейронов[41, 42]. Это увеличение происходит благодаря синтезу новых молекул ферментов и является специфичным. Другие ферменты синтеза и деградации норадреналина, такие как декарбоксилаза ароматических L-аминокислот и моноаминоксидаза, не подвержены такому воздействию.

Увеличение уровня ферментов запускается синаптической активацией симпатических нейронов (см. рис. 13.7). Такая **транс-синаптическая регуляция** представляет собой механизм, через который способности нейронов к синтезу медиаторов могут быть сопряжены со скоростью высвобождения медиаторов[43]. Эксперименты, проведенные на симпатичес-

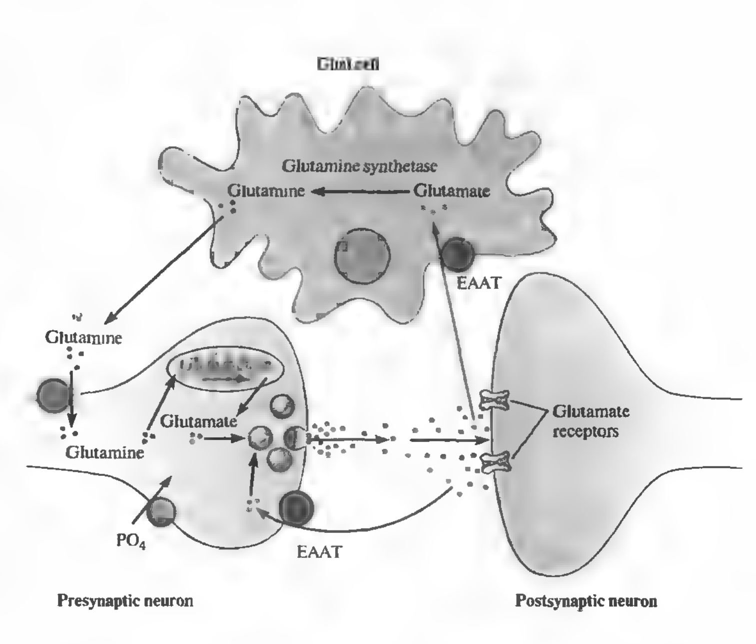


Рис. 13.10. Пути синтеза, хранения, высвобождения и захвата глутамата в глутаматергических нейронах. Глутамат синтезируется из глутамина в митохондриях с помощью фосфат-зависимой формы фермента глутаминазы. Транспортер неорганического фосфата (PO_4) расположен в глутаматергических терминалях. После высвобождения некоторое количество глутамата захватывается пресинаптическим окончанием; большая часть глутамата захватывается глиальными клетками и превращается в глутамин. Глутамин затем выбрасывается из глии и захватывается нервными окончаниями для последующего преобразования в глутамат. EAAT = транспортер возбуждающих аминокислот.

Fig. 13.10. Pathways for Glutamate Synthesis, Storage, Release, and Uptake in glutamatergic neurons. Glutamate is synthesized from glutamine within mitochondria by a phosphate-dependent form of the enzyme glutaminase. An inorganic phosphate (PO_4) transporter is localized to glutamatergic terminals. After release, some glutamate is taken up into presynaptic terminals; most is taken up by glial cells and converted to glutamine, which is then released and taken up into nerve terminals for conversion to glutamate. EAAT = excitatory amino acid transporter.

ких ганглиях человека, показали, что электрическая стимуляция преганглионарных волокон вызывает заметное повышение уровня мРНК тирозингидроксилазы и дофамин-β-гидроксилазы в течение 20 мин. Это свидетельствует о том, что регуляция генов, участвующих в синтезе норадреналина, является очень быстрой и зависит от внешних условий[44].

Синтез нейропептидов

Регуляция запасов пептидных медиаторов затруднена в связи с разделением мест их синтеза и высвобождения. Пептиды синтезируются на рибосомах, которые расположены в телах нервных клеток, а не в аксонах или нервных терминалях. Такая организация имеет два последствия: во-первых, скорость синтеза пептидов регулируется в телах клеток, после чего пептиды должны быть перенесены в терминаль аксонным транспортом (о котором уже кратко говорилось). Это процесс медленный по сравнению с быстрым местным контролем синтеза и хранения низкомолекулярных медиаторов внутри аксонных окончаний. Во-вторых, количество пептида, доступное для высвобождения, ограничено его количеством, имеющимся в терминали. Однако связывание пептидов с рецепторами происходит при значительно более низких концентрациях (в пределах 10^{-10}–10^{-8} М), чем связывание низкомолекулярных медиаторов, таких как ацетилхолин, с их рецепторами (10^{-7}–10^{-4}М). Механизмы, удаляющие пептидные медиаторы из синаптической щели, также в основном медленные. Более того, рецепторы нейропептидов, как и другие метаботропные рецепторы, действуют через внутриклеточные пути, обеспечивающие огромное усиление сигнала (глава 10). Вследствие этого для оказания воздействия на постсинаптическую мишень нужно небольшое число молекул пептида, так что потребность в необходимом для высвобождения количестве нейропептида может быть обеспечена транспортом молекул из тела клетки.

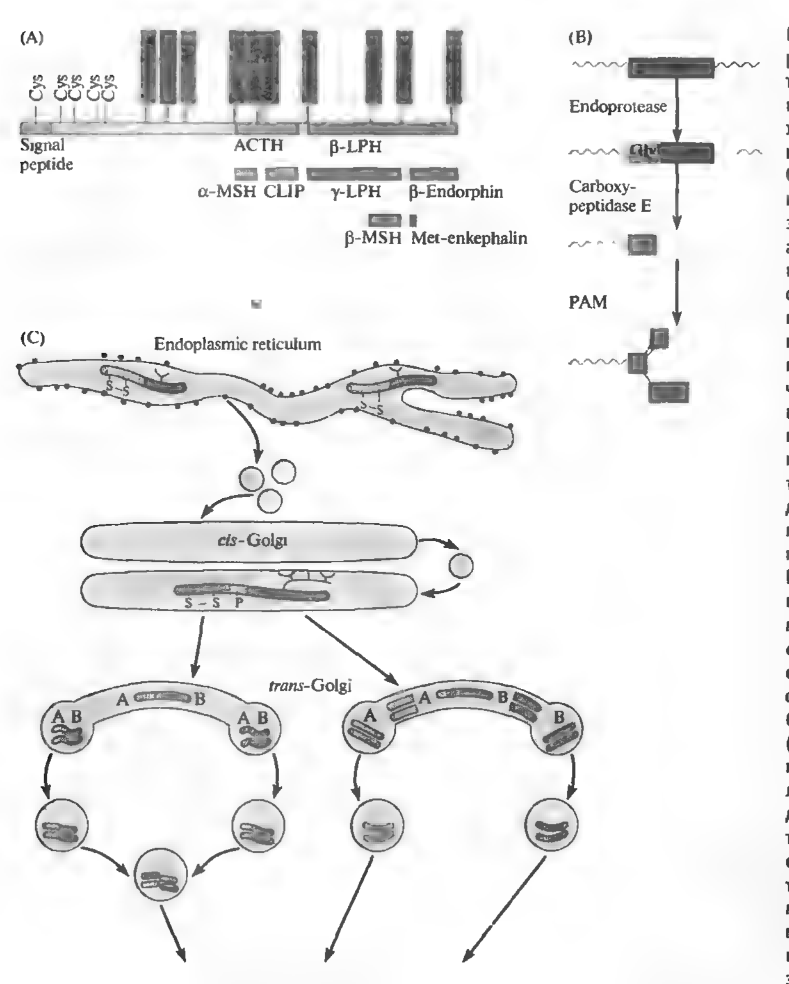


Рис. 13.11. Синтез нейропептидов. (A) Структура про-опиомеланокортина быка. Положения известных компонентов пептида изображены окрашенными прямоугольниками. Обозначены пары основных аминокислотных остатков, которые являются мишенями для ферментов. (B) Преобразование нейропептидных предшественников обычно начинается с отщепления карбокситерминальной части молекулы по положению, которое распознается эндопротеазой. Основные положения отделяются карбоксипептидазой E. Если пептид заканчивается глицином, фермент пептидил-глицин-α-амидирующая монооксигеназа (PAM) преобразует конечную карбоксигруппу в амидную. (C) Предшественники нейропептидов направляются в полость эндоплазматического ретикулума посредством сигнальной последовательности. В эндоплазматическом ретикулуме происходит образование дисульфидных связей и N-связанное гликозилирование. Затем нейропептид транспортируется через аппарат Гольджи, где происходят его дальнейшие модификации, такие как сульфатирование и фосфорилирование. Показаны две схемы упаковки. Слева пропептид упаковывается в пузырьки, отпочковывающиеся от аппарата Гольджи; по мере созревания везикул пропептид расщепляется, образуя два пептида (A и B), упакованные в одной везикуле. Справа пропептид расщепляется внутри аппарата Гольджи с последующей сортировкой пептидов в разные пузырьки.

Fig. 13.11. Synthesis of Neuropeptides. (A) Structure of bovine pro-opiomelanocortin. The locations of known peptide components are shown by colored boxes. Paired basic amino acid residues — common targets for processing enzymes — are indicated. (B) Processing of neuropeptide precursors usually begins with cleavage on the carboxy-terminal side of the recognition site by an endoprotease. The basic residues are trimmed by carboxypeptidase E. If the peptide ends in glycine, the enzyme peptidyl glycine α-amidating monooxygenase (PAM) converts the carboxy terminus to an amide. (C) Neuropeptide precursors are directed into the lumen of the endoplasmic reticulum by a signal sequence. In the endoplasmic reticulum, disulfide bonds are formed and N-linked glycosylation occurs. The propeptide is then transported through the Golgi apparatus, where further modifications, such as sulfation and phosphorylation, take place. Two packaging schemes are illustrated. On the left, a propeptide is packaged into vesicles budding from the Golgi; as the vesicle matures, the propeptide is cleaved, resulting in two peptides (A and B) packaged in the same vesicle. On the right, a propeptide is cleaved within the Golgi, followed by sorting of peptides into separate vesicles. (After Sossin, Fisher, and Scheller, 1989.)

Пептиды синтезируются в виде более крупных белков-предшественников, которые часто содержат последовательности нескольких биологически активных пептидов[45, 46] (табл. 13.1, рис. 13.11). Первыми этапами синтеза предшественника нейропептида являются стадии, типичные для синтеза секретируемых белков: синтез в эндоплазматическом ретикулуме, отщепление сигнального пептида, процессинг в аппарате Гольджи и включение в крупные (100–200 нм) электронно-плотные пузырьки. Более поздние этапы одинаковы для нейронов и эндокринных клеток. Эти шаги катализируются специфическими эндопротеазами, которые расщепляют белок-предшественник на соответствующие пептидные молекулы, экзопептидазами, устраняющими С-терминальные основные группы, и амидирующим бифункциональным ферментом, который превращает глициновый остаток в соответствующую амидную группу пептида (рис. 13.11В). Протеолитический процесс начинается в аппарате Гольджи и продолжается внутри крупных плотных везикул, в то время когда они транспортируются вниз по аксону и находятся в терминали. Некоторые клетки синтезируют более одного медиаторного пептида; эти пептиды могут быть различным образом рассортированы в пузырьки и направлены в разные терминали[47].

§ 3. Хранение медиаторов в синаптических пузырьках

Низкомолекулярные медиаторы, такие как АХ и НА синтезируются и упаковываются в пузырьки в аксонной терминали. На электронных микрофотографиях такие синаптические пузырьки выглядят мелкими (50 нм в диаметре) и могут быть прозрачными (т. е. АХ, аминокислотные медиаторы) или иметь электронноплотную сердцевину (т. е. биогенные амины). Концентрация низкомолекулярных медиаторов в пузырьках составляет 0,5 М, что значительно выше, чем в окружающей цитоплазме.

Накопление медиаторов в синаптических пузырьках осуществляется специфическими транспортными белками (рис. 13.12; см. также глава 4). Было установлено четыре везикулярных транспортера: транспортер всех биогенных моноаминов (названный VMAT), транспортер ГАМК и глицина, транспортер ацетилхолина (названный VAChT) и транспортер глутамата[48)–50]. Каждый из транспортеров является интегральным мембранным белком, имеющим 12 трансмембранных доменов. Мембраны синаптических везикул содержат также H^+-зависимую АТФазу, которая перекачивает протоны внутрь пузырьков, создавая там положительный заряд и более кислую среду по сравнению с цитоплазмой[51]. Для того чтобы перемещать молекулы медиатора внутрь пузырьков против градиента концентрации, везикулярные транспортеры медиаторов используют энергию электрохимического и pH градиентов. Из-за малого размера синаптические пузырьки, вероятно, содержат только одну копию протонной помпы, которая представляет собой большой комплекс, состоящий, по крайней мере, из 12 субъединиц.

Везикулярные транспортеры медиаторов не обладают такой же специфичностью, как постсинаптические рецепторы. Вследствие этого молекулы, которые не способны активировать постсинаптические рецепторы, иногда накапливаются в синаптических пузырьках и выбрасываются из аксонных терминалей в качестве псевдомедиаторов[52, 53].

Первыми были выделены и проанализированы биохимически пузырьки из надпочечника. Эти крупные пузырьки (200–400 нм в диаметре) называются хромаффинными гранулами, так как они окрашиваются солями хрома. Хромаффинные гранулы помимо катехоламинов содержат высокие концентрации АТФ, фермента дофамин-β-гидроксилазы и растворимых белков, называемых хромогранинами. Образование мультимолекулярных комплексов между положительно заряженными катехоламинами, отрицательно заряженным АТФ и хромогранинами, по-видимому, способствует упаковке и хранению катехоламинов в таких концентрациях, которые в иных условиях могли бы быть гиперосмотическими[54]. Кроме того, высвобождение катехоламинов сопровождается выбросом АТФ, который оказывает свои собственные эффекты, и таким образом действует как котрансмиттер[55, 56]. Было показано также, что один из белков, хромогранин А, служит предшественником ряда пептидов, которые модулируют секрецию[56].

Были выделены синаптические пузырьки из периферических холинергических и норадренергических терминалей и из центральной нервной системы. В норадренергических нервных окончаниях имеются крупные

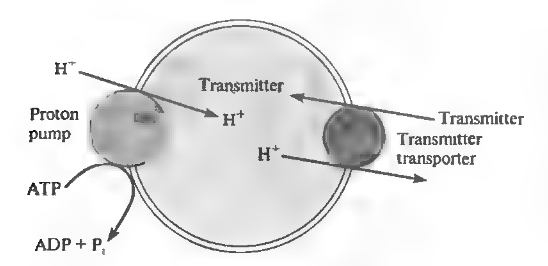


Рис. 13.12. Транспорт медиаторов в синаптические пузырьки управляется протонным электрохимическим градиентом. АТФ-зависимая помпа транспортирует протоны в синаптические пузырьки, создавая внутри везикул кислую и положительно заряженную относительно цитоплазмы среду. Нейромедиаторы переносятся в пузырьки специфическими транспортерами, энергетически сопряженными с протонным электрохимическим градиентом.

Fig. 13.12. Transport of Transmitters into Synaptic Vesicles Is Driven by a Proton Electrochemical Gradient. An ATP-powered pump transports protons into synaptic vesicles, making the vesicle interior acidic and positive relative to the cytoplasm. Neurotransmitters are carried into the vesicles by specific transporters, energetically coupled to the proton electrochemical gradient.

плотные пузырьки (70–200 нм в диаметре), которые похожи на хромаффинные гранулы. Эти пузырьки содержат хромогранины, растворимую форму дофамин-β-гидроксилазы и пептидные нейромедиаторы. В катехоламин-содержащих нервных терминалях, так же как и в холинергических нервных окончаниях, находится большое число мелких синаптических пузырьков, в которых содержится незначительное количество растворимого белка. Синаптические пузырьки, содержащие ацетилхолин и большинство биогенных аминов, также содержат высокие концентрации АТФ[57, 58]. В везикулах, содержащих серотонин, находится мало АТФ, но имеется большое количество белка, с высокой аффинностью связывающего 5-НТ[59]. Несмотря на то, что захват АТФ в катехоламин- и АХ-содержащие пузырьки был охарактеризован[54, 60], транспортер АТФ еще не идентифицирован. Некоторые нейроны спинного мозга высвобождают и ГАМК, и глицин[15]. Тот факт, что эти два медиатора имеют один и тот же везикулярный транспортер[61, 62], дают основания полагать, что ГАМК и глицин упаковываются вместе в одни и те же пузырьки.

§ 4. Аксонный транспорт

Белки, которые обнаруживают в аксонных окончаниях, должны доставляться туда из тела клетки, где они синтезируются. Первые доказательства передвижения вещества вдоль аксонов были получены в экспериментах Вейсса с коллегами. Они пережимали периферические нервы с помощью лигатуры и наблюдали разбухание аксонов выше места пережатия. После устранения лигатуры происходило перемещение накопившегося вещества вдоль аксона[63]. Эти эксперименты свидетельствуют, что в нормальных условиях существует постоянное объемное перемещение аксоплазмы вдоль аксона со скоростью 1–2 мм в день, которое получило название «аксоплазматического тока». Эта идея была подтверждена позднее в экспериментах с использованием радиоактивно меченых аминокислот, которые перемещались в составе белков от тел нервных клеток по периферическим и центральным аксонам[64]. Такое передвижение наблюдалось даже в одиночных аксонах в клеточной культуре (рис. 13.13)[65].

Скорость и направленность аксонного транспорта

Характерные различия в скорости передвижения широкого спектра транспортируемых по аксону компонентов были показаны при измерении времени накопления веществ выше места пережатия аксона и в аксонных терминалях. Структурные белки, такие как тубулин и белки нейрофиламентов, перемещаются с самой медленной скоростью, 1–2 мм в день; клеточные органеллы, такие как митохондрии и пузырьки (включая синаптические пузырьки, содержащие медиаторы) движутся значительно быстрее (до 400 мм в день)[66]. Такое быстрое перемещение невозможно объяснить только объемным током цитоплазмы. В связи с этим был принят термин **аксонный транспорт**.

Некоторые белки и органеллы движутся по направлению к аксонным окончаниям (**антероградный транспорт**), а другие перемещаются от окончаний к телу клетки (**ретроградный транспорт**)[66, 67]. Ретроградный транспорт покрытых мембраной органелл способствует возврату веществ в тело клетки для переработки или распада и, как было показано, является

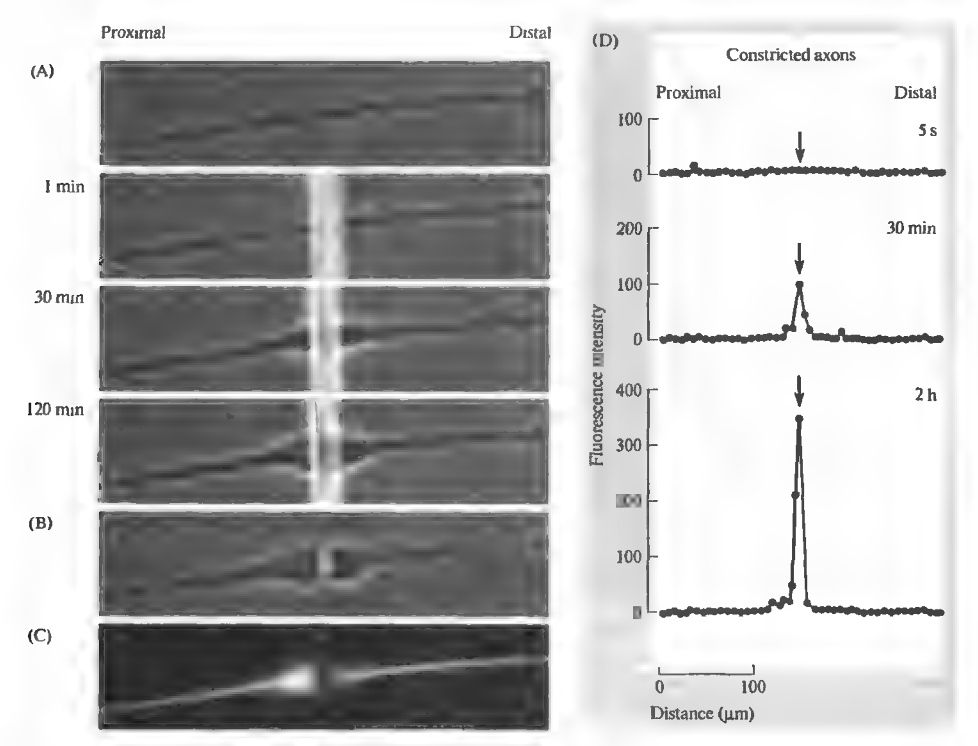


Рис. 13.13. Медленный аксонный транспорт был продемонстрирован в результате накопления компонентов цитоскелета в месте пережатия аксона. Одиночный аксон в культуре нейронов ганглия корешка спинного мозга крысы был пережат путем сдавливания стеклянным волокном. (A) На фотографиях, полученных методом фазового контраста, показаны аксоны непосредственно перед пережатием и через 1, 30 и 120 мин. (B) Через два часа после пережатия клетку фиксировали и стеклянное волокно убирали. (C) Флуоресцентная микрофотография аксона, меченного антителами в белку нейрофиламентов. (D) Зависимость интенсивности флюоресценции от расстояния по аксону, который был пережат в течение 5 с, 30 мин или 2 ч. Время накопления белка нейрофиламентов в точке пережатия аксона (стрелка) показывает, что средняя скорость транспорта была примерно 3 мм в день.

Fig. 13.13. Slow Axonal Transport is demonstrated by the accumulation of cytoskeletal components at the site of axonal constriction. A single axon from a cultured rat dorsal root ganglion neuron was constricted by pressure from a glass fiber. (A) Phase-contrast images show the axon immediately before constriction and after 1, 30, and 120 min. (B) Two h after constriction the cell was fixed, and the glass fiber removed. (C) Fluorescence micrograph of the axon labeled with antineurofilament protein antibodies. (D) Graphs of fluorescence intensity as a function of distance along axons constricted for 5 s, 30 min, or 2 h. The time course of accumulation of neurofilament protein at the site of the constriction (arrow) indicated that the average transport rate was approximately 3 mm/day. (After Koehnle and Brown, 1999; micrographs kindly provided by A. Brown.)

основным способом передвижения трофических молекул, таких как фактор роста нервов, от аксонных терминалей к телам клеток (глава 23)[68].

Нейроанатомы разработали методы исследования аксонного транспорта, основанные на использовании специальных маркеров (так называемых трейсеров), таких как пероксидаза хрена, флуоресцентно меченые гранулы и даже вирусы, которые переносятся по аксону в антероградном и ретроградном направлении. Использование таких маркеров дает возможность картирования синаптических контактов путем визуализации индивидуальных аксонов, их терминального ветвления и тел клеток даже на больших расстояниях[69, 70].

Микротрубочки и быстрый транспорт

В ранних экспериментах было показано, что аксонный транспорт требует затрат энергии и наличия интактных микротрубочек, но в те-

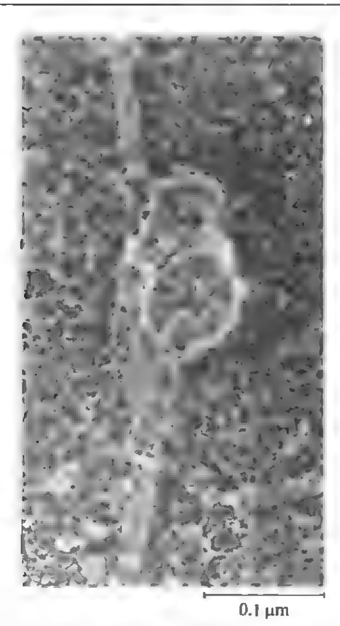


Рис. 13.14. Идентификация органелл и путей, участвующих в быстром аксонном транспорте. Электронная микрофотография пузырька, прикрепленного к микротрубочке в аксоплазме кальмара. С помощью световой микроскопии было установлено, что до фиксации эта органелла двигалась вдоль волоконного пути со скоростью, соответствующей скорости быстрого аксонного транспорта. Электронная микрофотография показывает, что эта органелла является синаптической везикулой, а ее путь — микротрубочкой. Гранулярный и волоконный материал расположен на стеклянном субстрате.

Fig. 13.14. Identifying the Organelles and Tracks Mediating Fast Axonal Transport. Electron micrograph of a vesicle attached to a microtubule in extruded squid axoplasm. Before fixation this organelle was observed by light microscopy moving along a filamentous track at a rate corresponding to fast axonal transport. The electron micrograph shows that the organelle is a synaptic vesicle, and the track is a microtubule. A layer of granular and finely filamentous material coats the glass substrate. (From Schnapp et al., 1985.)

чение 30 лет очень мало достигнуто в понимании механизмов этого процесса. Два технологических достижения дали возможность очень быстро продвинуться в исследовании этой проблемы: (1) развитие методов микроскопии, которые позволили напрямую визуализировать единичные пузырьки внутри клеток[71, 72] и (2) открытие того, что движение везикул происходит и в бесклеточной среде, такой как аксоплазма кальмара[73]. Исследования Риза, Шитца, Шнэппа, Вэйла, Блока и их коллег показали, что транспорт происходит путем прикрепления органелл, таких как митохондрии или пузырьки, к микротрубочкам. Механохимические ферменты, или моторы, расщепляют молекулу АТФ и используют полученную энергию для переноса органелл по «колее» микротрубочки (рис. 13.14)[74, 75].

Микротрубочки обладают собственной полярностью; в аксонах «положительно заряженный» полюс расположен на дистальном конце аксонной терминали. Антероградный транспорт осуществляется белком кинезином (kinesin), который перемещает органеллы по направлению к положительно заряженному полюсу; ретроградный транспорт осуществляется цитоплазматическим белком динеином (dynein), который перемещает органеллы по направлению к отрицательному полюсу (рис. 13.15)[76]. Специфические рецепторы на поверхности органелл обусловливают присоединение к ним или кинезина, или цитоплазматического динеина и, таким образом, определяют направление движения органелл (рис. 13.16)[77]. Было показано, что один кинезиновый мотор перемещает органеллу вдоль микротрубочки со скоростью, эквивалентной скорости быстрого аксонного транспорта[78]; гидролиз одной молекулы АТФ обеспечивает энергией «шаг» длиной приблизительно 8 нм, что соответствует расстоянию от одного димера $\alpha\beta$-тубулина до следующего вдоль протофиламента микротрубочки[79, 80]. Различия в скорости транспорта разных компонентов обусловлены долей времени, в течение которого они остаются «в колее», и тем сопротивлением, которое они встречают по мере прохождения через плотное переплетение элементов цитоскелета в аксоне.

Механизм медленного аксонного транспорта

Растворимые белки и элементы цитоскелета, такие как микротрубочки и нейрофиламенты, переносятся от тела клетки к аксонному окончанию медленным транспортом[66]. До сих пор обсуждается вопрос о том, транспортируются ли микротрубочки и нейрофиламенты в виде интактных полимеров[81] или, если полимеризация филаментов является стационарным процессом, транспортируются ли мономеры или олигомеры нейрофиламентов[82]. Ясно лишь, что аксонный транспорт белков цитоскелета не может осуществляться путем диффузии, а является активным процессом.

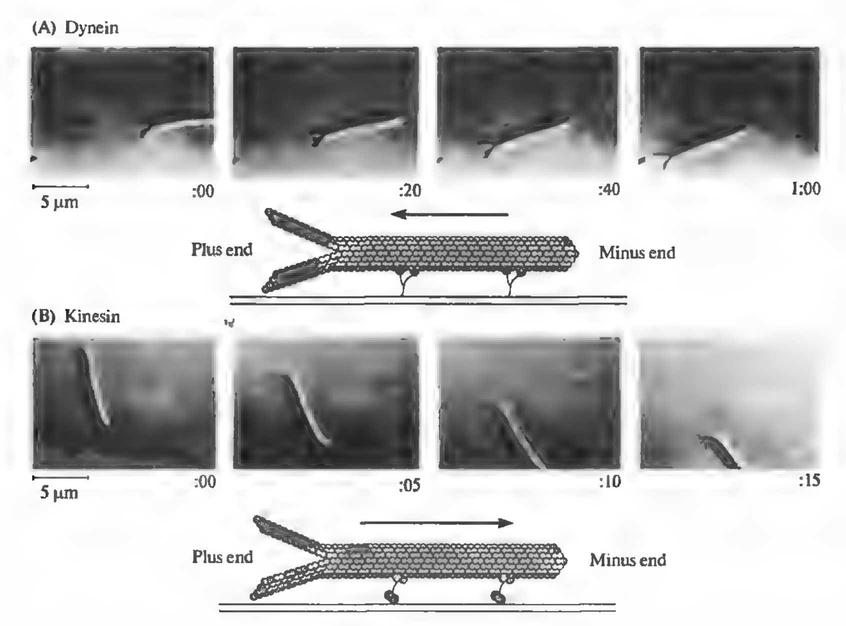


Рис. 13.15. Молекулярные моторы динеин и кинезин двигают микротрубочки в противоположных направлениях. (A, B) Последовательные изображения движения фрагментов микротрубочек на очищенных «моторах» быстрого транспорта. Время показано в минутах. Очищенные цитоплазматический динеин (A) и кинезин (B) осаждали на покровных стеклах, добавляли фрагменты микротрубочек. После контакта фрагментов с поверхностью они двигались в направлении их раздвоенного (дистального или +) конца на динеине и в направлении компактного (проксимального или −) конца на кинезине, как показано на рисунке.

Fig. 13.15. The Molecular Motors Dynein and Kinesin Propel Microtubules in Opposite Directions. (A, B) Sequential images of the movement of microtubule fragments on purified fast-transport "motors." Time is indicated in minutes. Purified cytoplasmic dynein (A) or kinesin (B) was adsorbed to a coverslip, and fragments of microtubules were added. When the fragments contacted the surface, they were propelled toward their frayed (distal or +) end on dynein and toward their compact (proximal or −) end on kinesin, as illustrated. (After Paschal and Vallee, 1987; micrographs kindly provided by R. Vallee.)

§ 5. Высвобождение медиаторов и метаболический круговорот везикул

Квантовое высвобождение медиаторов путем экзоцитоза везикул (глава 11) ставит ряд фундаментальных вопросов: как распределены синаптические пузырьки в нервных терминалях? Какие механизмы рекрутируют пузырьки в активную зону? Как вход кальция в клетку запускает экзоцитоз?

Сортировка везикул в нервном окончании

Не все пузырьки одинаковы. Исследования с использованием радиоактивных предшественников, которые включаются в медиаторы в процессе синтеза и затем поступают в пузырьки и высвобождаются из окончаний, предполагают, что существуют разные субпопуляции везикул в аксонных терминалях. Например, при стимуляции электрического органа морского ската *Torpedo* было установлено, что синтезированный вновь АХ не распределяется равномерно по синаптическим пузырькам, а локализован в тех везикулах, которые недавно образовались по завершении цикла круговорота[83, 84]. Изучение аксонных терминалей моторных и симпатических нейронов млекопитающих показало, что высвобождаются преимущественно вновь синтезированные молекулы медиатора[20, 85]. Такие результаты дают возможность предположить, что существует субпопуляция пузырьков, которые подвергаются быстрому круговороту, в то время как большинство везикул находится в резерве. Данные о том, что везами-

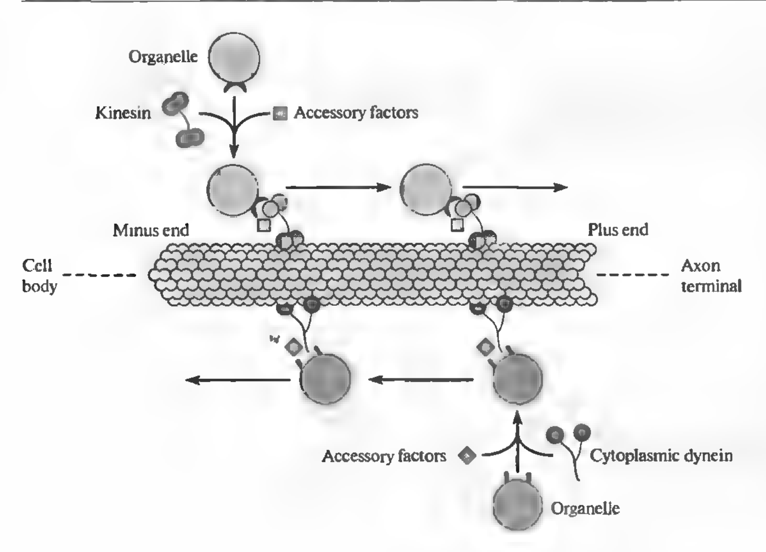


Рис. 13.16. Быстрый аксонный транспорт управляется кинезином и динеином. В аксоне микротрубочки стационарны и обладают полярностью: положительный конец направлен к аксонной терминали, а отрицательный — к телу клетки. Кинезин и цитоплазматический динеин вместе с дополнительными факторами прикрепляют органеллы и двигают их по направлению к аксонной терминали и телу клетки соответственно.

Fig. 13.16. Fast Axonal Transport Powered by Kinesin and Dynein. In the axon, microtubules are stationary and have a polarity: The plus end points toward the axon terminal, the minus end toward the cell body. Kinesin and cytoplasmic dynein, together with accessory factors, attach to organelles and propel them toward the axon terminal and cell body, respectively. (After Vallee, Shpetner, and Paschal, 1989.)

кол, специфически нарушающий транспорт АХ в синаптические пузырьки, избирательно блокирует высвобождение новообразованного АХ[22], соответствуют приведенной схеме. Существование разных пулов везикул в аксонных окончаниях удалось подтвердить некоторым авторам в экспериментах[86] с использованием флуоресцентного красителя, но не удалось другим[87].

Деление пузырьков на разные субпопуляции требует, чтобы их движение было организовано определенным образом. Если бы синаптические пузырьки двигались свободно по законам броуновского движения, они должны бы были равномерно перемешиваться в нервных окончаниях. Кроме того, в экспериментах с использованием метода так называемого восстановления флюоресценции после фотообесцвечивания (FRAP) было установлено, что в окончаниях моторного нерва лягушки пузырьки не диффундируют свободно (рис. 13.17)[88]. В этих экспериментах пузырьки метили флуоресцентным красителем, и небольшой участок кластера меченых везикул обесцвечивали. Индикатором того, что пузырьки не могут свободно перемещаться в стороны, было то, что обесцвеченное пятно сохранялось даже в процессе высвобождения медиатора.

Грингард с коллегами открыли в аксонах и аксонных терминалях семейство белков, названных синапсинами (synapsin), которые прикрепляют пузырьки к цитоскелету, препятствуя их движению[89, 90]. Интересно, что связывание синапсинов с везикулами регулируется фосфорилированием; добавление фосфатных групп к синапсинам способствует их отсоединению от пузырьков. Эксперименты Ллинаса с коллегами[91] иллюстрируют одну из функций, которую может выполнять такое ограничение движения пузырьков в высвобождении нейромедиатора. Эти авторы вводили дефосфорилированный синапсин I в пресинаптическую терминаль гигантского аксона кальмара, что вызывало снижение количества медиатора, высвобождаемого вследствие стимуляции нерва. Последующее введение протеинкиназы, специфично фосфорилирующей синапсин I, приводило к увеличению количества высвобождаемого медиатора. Таким образом, в нормальных условиях активность эндогенных киназ и фосфатаз может модулировать количество медиатора, высвобождаемого из аксонной терминали, регулируя фосфорилирование синапсинов.

Консервативные механизмы транспорта синаптических пузырьков

Как синаптические пузырьки переносятся к плазматической мембране и выбрасыва-

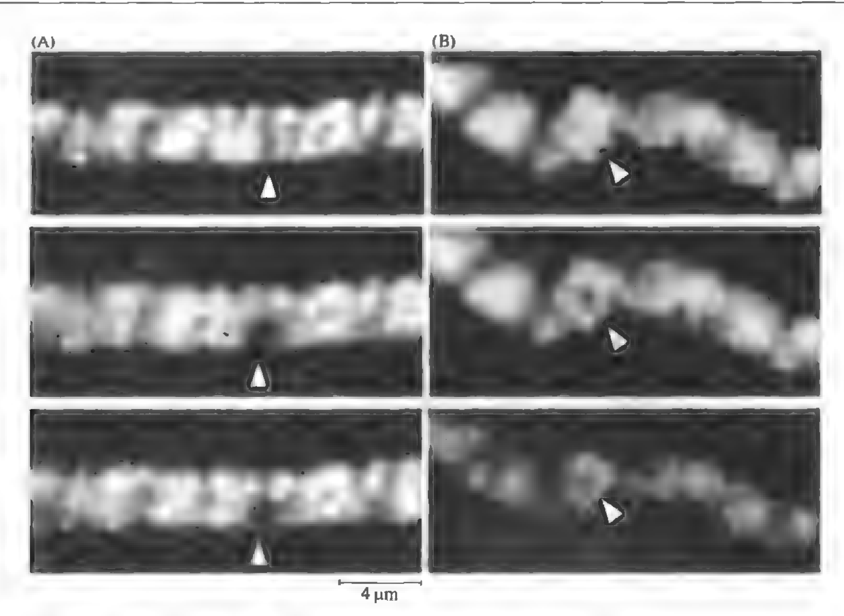


Рис. 13.17. Ограниченное движение синаптических везикул в нервной терминали. Флуоресцентные микрофотографии нервных окончаний лягушки, в которых синаптические пузырьки были помечены флуоресцентным красителем. (A) Нервное окончание до (вверху), непосредственно после (в середине) и через 28 мин после (внизу) обесцвечивания окраски в небольшом пятне в группе везикул интенсивным освещением. Обесцвеченный участок (стрелка) остается почти неизменным через 28 мин после освещения, что указывает на незначительное спонтанное перемещение окрашенных везикул. (B) То же, что и на рисунке A, за исключением того, что после обесцвечивания терминаль стимулировали током с частотой 10 Hz в течение 5 мин. Хотя группы везикул бледнели, так как высвобождали окрашенное содержимое в ходе экзоцитоза, этот процесс не затрагивал обесцвеченный участок, что говорит об отсутствии передвижения окрашенных везикул в эту область.

Fig. 13.17. Restricted Movement of Synaptic Vesicles within Nerve Terminals. Fluorescence micrographs of frog nerve terminals in which synaptic vesicles have been labeled with a fluorescent dye. (A) Resting nerve terminal before (top), immediately after (middle), and 28 min after (bottom) bleaching the dye in a small spot among the vesicle clusters with intense illumination. The bleached region (arrowhead) is nearly unchanged after 28 min, indicating little spontaneous movement of dye-containing vesicles. (B) As in part A, except after bleaching the terminal was stimulated at 10 Hz for 5 min. Although all the vesicle clusters dim as vesicles undergo exocytosis and release their dye, no increase in fluorescence occurs in the bleached region, indicating no net movement of dye-containing vesicles into this area. (After Henkel et al. 1996; micrographs kindly provided by W. J. Betz.)

ют свое содержимое в синаптическую щель? Для того чтобы охарактеризовать компоненты нервных окончаний, участвующие в этих процессах, были проведены эксперименты[92], которые привели к открытию нескольких белков, локализованных в синапсе, гомологичных белкам, необходимым для процессов секреции у дрожжей[93] и для везикулярного транспорта в аппарате Гольджи[94]. Понимание того, что в основе всех видов мембранного транспорта лежат одни и те же базовые механизмы, послужило основанием для быстрого прогресса в этой области исследований. Генетические, физиологические и биохимические подходы позволили выявить последовательность шагов, в результате которой происходит экзоцитоз медиаторов[95, 96]. Первым шагом является образование комплекса между белками мембраны синаптического пузырька и белками активной зоны на пресинаптической мембране. Этот комплекс удерживает везикулу в фиксированной позиции и способствует слиянию мембран в ответ на приток кальция. Белки, способствующие присоединению и слиянию мембран, называются SNARE, сокращенно от «рецептор SNAP», так как они были впервые идентифицированы в качестве рецепторов другого белка, необходимого для секреции у дрожжей, называемого растворимый прикрепляющий бе-

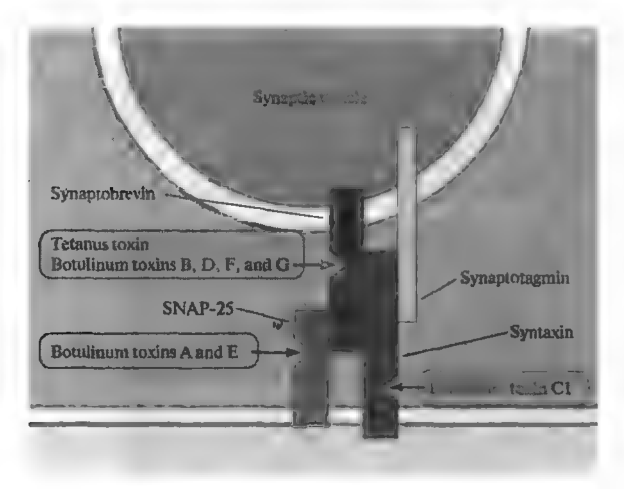


Рис. 13.18. Места действия столбнячного и ботулинового токсинов. Эти токсины являются протеазами, которые разрушают компоненты SNARE комплекса. Ботулиновый токсин C1 действует на синтаксин, ботулиновые токсины A и E разрушают SNAP-25 и ботулиновые токсины B, D, F и G и столбнячный токсин воздействуют на синаптобревин.

Fig. 13.18. Site of Action of Tetanus and Botulinum Toxins. These toxins are proteases that degrade components of the SNARE complex. Botulinum toxin C1 acts on syntaxin, botulinum toxins A and E degrade SNAP-25, and botulinum toxins B, D, F, and G and tetanus toxin target synaptobrevin.

лок NSF (NSF attachment protein), или SNAP. В соответствии с этим представленная схема прикрепления и слияния мембран получила название **SNARE-гипотеза**.

Синаптотагмин и зависимость высвобождения медиаторов от кальция

Белок, известный как синаптотагмин (synaptotagmin), является кальциевым сенсором для высвобождения медиаторов[95)]. Связываясь с кальцием в определенном интервале концентраций, синаптотагмин изменяет степень своего взаимодействия с белками синаптических пузырьков и плазматической мембраны. У мутантных животных, у которых отсутствует ген, кодирующий синаптотагмин, стимуляция аксона не оказывает эффекта или имеет незначительное воздействие на высвобождение медиаторов, хотя спонтанное высвобождение медиаторов повышено. Таким образом, синаптотагмин действует как прерыватель, предотвращающий слияние мембран в отсутствие кальция и усиливающий слияние мембран и экзоцитоз при поступлении кальция внутрь клетки.

Связывание кальциевых каналов и SNARE белков плазматической мембраны — синтаксина (syntaxin) и SNAP-25 — может играть роль в колокализации кальциевых каналов и мест высвобождения медиатора[97)]. Кальциевый канал и синаптотагмин также связываются друг с другом, что может переводить синаптотагмин в положение, в котором он оказывается возле открытых каналов на участке повышенной концентрации кальция[98)].

Бактериальные нейротоксины нацелены на SNARE комплекс

Идентификация SNARE комплекса позволила понять механизм действия сильных нейротоксинов, вырабатываемых бактерией *Clostridium*: токсинов столбняка и ботулизма[99)]. Одной молекулы этих токсинов достаточно для того, чтобы предотвратить высвобождение медиатора из нервного окончания. Каждый токсин состоит из легкой и тяжелой цепей, соединенных дисульфидной связью. Тяжелая цепь связывается с плазматической мембраной и переносит токсин внутрь нервного окончания. После этого дисульфидный мостик расщепляется и легкая цепь действует как эндопротеаза, которая специфически разрушает компоненты SNARE комплекса (рис. 13.18).

Восстановление компонентов мембран синаптических пузырьков путем эндоцитоза

Как описано в главе 11, после экзоцитоза компоненты мембраны синаптических пузырьков возвращаются обратно в клетку и используются повторно, совершая метаболический круговорот. Наиболее исследованным путем круговорота является путь классического эндоцитоза, при котором мембрана пузырька полностью сливается с пресинаптической мембраной в процессе экзоцитоза, и компоненты везикулярной мембраны возвращаются обратно путем эндоцитоза в виде фрагментов, покрытых клатрином (рис. 13.19)[100)]. Помимо клатрина этот процесс требует участия

Рис. 13.19. Два пути круговорота везикулярных мембран после экзоцитоза. Наиболее охарактеризован путь, при котором пузырьки сливаются с плазматической мембраной после экзоцитоза, компоненты мембран возвращаются с помощью опосредованного клатрином эндоцитоза и образуют новые пузырьки. В некоторых синапсах происходит экзоцитоз по принципу «поцеловал и убежал», при котором пузырьки быстро отсоединяются после экзоцитоза без слияния с плазматической мембраной.

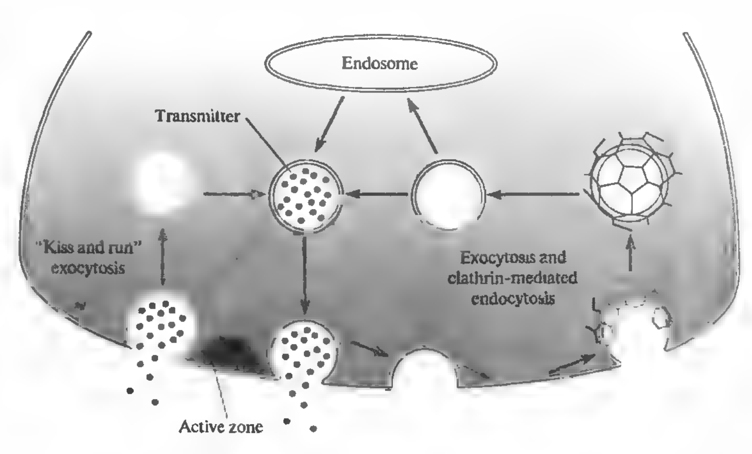


Fig. 13.19. Two Pathways for Vesicle Membrane Recycling after exocytosis. In the best-characterized pathway, vesicles flatten into the plasma membrane after exocytosis, and components are recycled via clathrin-mediated endocytosis and formation of new vesicles. At some synapses there is evidence for "kiss and run" exocytosis, in which vesicles rapidly pinch off after exocytosis without merging with the plasma membrane.

адапторных белков, которые отбирают подходящие для повторного использования элементы, и динамина (dynamin), кальций-зависимой ГТФазы, которая отщепляет покрытые клатрином пузырьки от плазматической мембраны[101]. Для описания механизмов повторного использования компонентов, захваченных в процессе эндоцитоза, были предложены две схемы. Первая предполагает прямое образование новых синаптических пузырьков после утраты клатриновой оболочки эндосомных везикул. Вторая — необходимость прохождения специального эндосомального отдела, в котором и образуются новые синаптические пузырьки. Считается, что круговорот синаптических пузырьков путем эндоцитоза в основном занимает от 30 с до 1 мин[102, 103]; однако эксперименты, выполненные на нервно-мышечном контакте змеи, свидетельствуют о том, что этот процесс может протекать намного быстрее[104].

Альтернативная гипотеза состоит в том, что пузырьки отсоединяются сразу же после высвобождения их содержимого без слияния с плазматической мембраной (см. рис. 13.19)[105]. Такая схема экзоцитоза по принципу «поцеловал и убежал» ("kiss and run") была предложена для очень быстрого круговорота пузырьков, который имеет место в некоторых синапсах, например, в центральных синапсах, где происходит выброс медиатора из небольшого числа пузырьков пресинаптических окончаний, но с большой частотой.

§ 6. Локализация рецепторов медиаторов

В синапсах центральной нервной системы ионотропные рецепторы сконцентрированы в постсинаптической мембране непосредственно под нервным окончанием (глава 9); метаботропные рецепторы имеют меньшую плотность и не так точно локализованы. Например, в глутаматергических синапсах коры мозжечка[106] и гиппокампа[107] млекопитающих ионотропные рецепторы АМРА-типа занимают постсинаптическую мембрану прямо напротив мест высвобождения медиатора, тогда как метаботропные рецепторы локализованы в окружающей удаленной части постсинаптической мембраны.

Как рецепторы медиаторов столь точно удерживаются в данном конкретном месте? В нервно-мышечном контакте скелетной мускулатуры позвоночных АХР являются неподвижными, так как они представляют собой часть постсинаптического аппарата, образованного белками цитоскелета, а также мембранными и мембрано-связанными белками (рис. 13.20)[108, 109]. Как полагают, в постсинаптическом аппарате 43 кДа белок рапсин (rapsyn), ассоциированный с АХР,

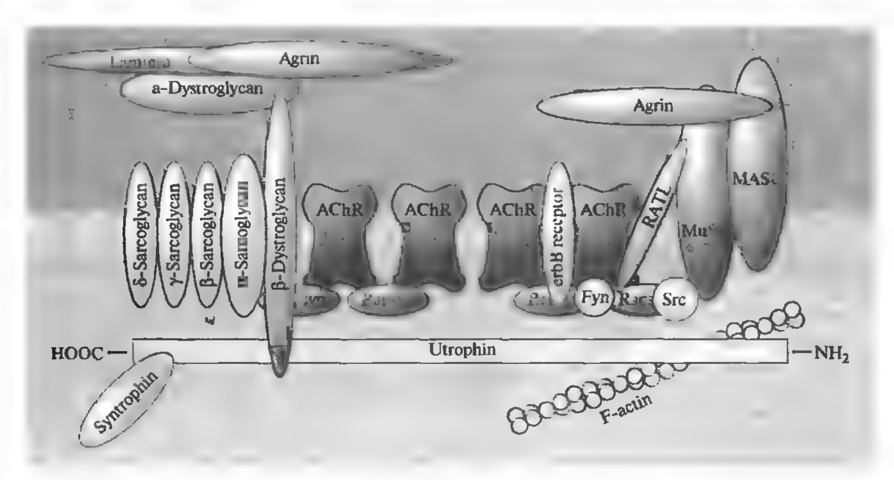


Рис. 13.20. Постсинаптические компоненты насыщенного AChR участка скелетного нервно-мышечного контакта позвоночных. Дистрофиновый гликопротеиновый комплекс (утрофин, α- и β-дистрогликан и саркогликаны) скрепляют цитоскелет, мембрану и экстраклеточный матрикс. Агрин соединяется с ламинином и α-дистрогликаном и передает сигнал с помощью рецептора тирозинкиназы MuSK, запуская формирование постсинаптического аппарата в процессе онтогенеза (глава 23). Рапсин играет ключевую роль в связывании MuSK и AChR с цитоскелетом. RATL и MASC являются еще неустановленными компонентами, которые обеспечивают взаимодействие MuSK с рапсином и агрином соответственно.

Fig. 13.20. Postsynaptic Components of AChR-Rich Regions at the vertebrate skeletal neuromuscular junction. The dystrophin glycoprotein complex (utrophin, α- and β-dystroglycan, and the sarcoglycans) links together the actin cytoskeleton, the membrane, and the extracellular matrix. Agrin binds to laminin and α-dystroglycan and signals through the receptor tyrosine kinase MuSK to trigger formation of the postsynaptic apparatus during development (Chapter 23). Rapsyn plays a key role in linking MuSK and AChRs to the cytoskeleton. RATL and MASC are as yet unidentified components that mediate interaction of MuSK with rapsyn and agrin, respectively.

и компоненты комплекса дистрофина (dystrophin) играют определенную роль в локализации АХР. Дистрофиновый комплекс, который связывает вместе миофибриллы цитоскелета, мембрану и окружающий внеклеточный матрикс, также обеспечивает структурную опору для мышечной клетки. Мутации компонентов этого комплекса являются причиной развития мышечной дистрофии Дюшене, при которой мышечные волокна повреждаются и дегенерируют[110)].

В тормозных синапсах центральной нервной системы глициновые рецепторы «заякорены» в цитоскелете с помощью тубулинсвязывающего белка гефирина (gephyrin)[111)]. Гефирин также необходим и для локализации ГАМК$_A$ рецепторов в постсинаптической мембране, хотя прямого взаимодействия между гефирином и субъединицами ГАМК$_A$ рецепторов не было продемонстрировано. Гефирин взаимодействует с несколькими внутриклеточными компонентами, которые обеспечивают ответ клетки на активацию или действие трофических факторов. Такие взаимодействия, вероятно, играют центральную роль в создании и стабилизации постсинаптической специализации в тормозных синапсах.

В возбуждающих синапсах центральной нервной системы были обнаружены три семейства белков, которые взаимодействуют с глутаматными рецепторами (рис. 13.21)[112, 113)]. Белки каждого из семейств имеют один или более PDZ доменов, которые являются консервативными регионами, опосредующими белок-белковые взаимодействия. Глутаматные рецепторы NMDA-типа связаны с белками семейства PSD–95, которые являются главными компонентами, образующими постсинаптическое уплотнение. Глутаматные рецепторы AMPA-типа соединены с белками семейства GRIP. Метаботропные глутаматные рецепторы связаны с членами семейства Homer белков. Первоначально внимание исследователей было сконцентрировано на той роли, которую такие белки играют в локализации рецепторов в определенных местах на синаптической мембране. Однако стало ясно, что эти белки также играют важную роль в создании внутриклеточной структуры, которая активирует (рекрутирует) внутриклеточные сигналь-

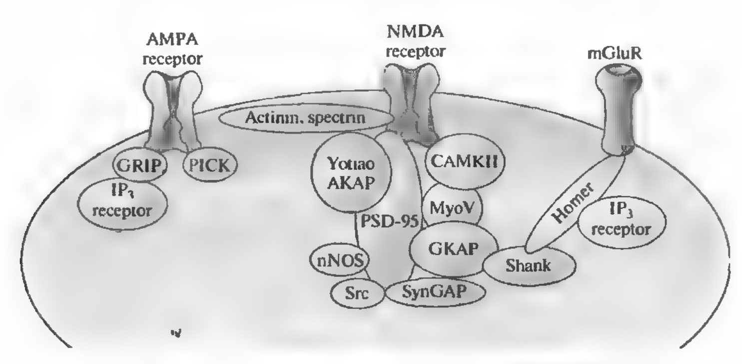


Рис. 13.21. Глутаматные рецепторы связаны с постсинаптическим скаффолдом (этажеркой), который включает белки, вовлеченные во внутриклеточные сигнальные каскады. Члены семейства белков GRIP связывают AMPA рецепторы с рецептором IP_3. PSD–95 и его гомологи соединяют NMDA рецепторы с Yotiao, nNOS, Src, SynGAP и GKAP. CaMKII связывает NMDA рецептор с MyoV. Семейство Хомерных белков соединяет метаботропный глутаматный рецептор с Shank и, таким образом, связывает его с комплексом NMDA рецептора.

Fig. 13.21. Glutamate Receptors Are Linked to a Postsynaptic Scaffold that includes proteins involved in intracellular signaling cascades. Members of the GRIP protein family link AMPA receptors to the IP_3 receptor. PSD–95 and its homologues connect NMDA receptors to Yotiao, nNOS, Src, SynGAP, and GKAP. CaMKII binds to NMDA receptors and to MyoV. The Homer protein family links metabotropic glutamate receptors to Shank and thereby to the NMDA receptor complex. (After Sheng and Lee, 2000.)

ные белки, включая синтазу оксида азота, рецептор тирозинкиназ Raf, MAP и Rsk-киназы, рецепторы IP_3 и Ras-подобные малые ГТФазы[113]. Таким образом, эти белки могут не только определять расположение рецепторов, но также детерминировать последствия активации рецепторов.

Пресинаптические рецепторы

Рецепторы нейромедиаторов также обнаружены и на пресинаптических нервных окончаниях. Такие пресинаптические рецепторы регулируют высвобождение медиаторов (глава 10) и могут участвовать в механизме высвобождения как таковом (глава 11).

§ 7. Удаление медиаторов из синаптической щели

Финальным шагом химической синаптической передачи является удаление медиатора из синаптической щели. Механизмы удаления медиатора включают диффузию, распад и захват глиальными клетками или нервными окончаниями.

Удаление АХ ацетилхолинэстеразой

Как описано в главе 9, действие АХ прекращается ферментом ацетилхолинэстеразой (АХЭ), который гидролизует АХ до холина и ацетата. Большая часть холина транспортируется обратно в нервное окончание и вновь используется для синтеза АХ. В нервно-мышечных синаптических контактах скелетных мышц позвоночных ацетилхолинэстераза связана с синаптическим базальным слоем, то есть с той частью материала внеклеточного матрикса оболочки мышечного волокна, которая занимает синаптическую шель и складки контакта (рис. 13.22)[114]. В синаптическом базальном слое расположено 2 600 каталитических субъединиц АХЭ на квадратный микрометр[115] (для сравнения: в постсинаптической мембране находится 10^4 АХР на квадратный микрометр).

Такое расположение АХЭ между аксонным окончанием и постсинаптической мембраной, заставляющее молекулы АХ пересекать минное поле из расщепляющих ферментов до того, как они смогут вступить во взаимодействие с постсинаптическими рецепторами, может показаться неэффективным. Однако, если принять во внимание размеры синаптической щели и скорость диффузии, связывания и гидролиза АХ, то возникает простая схема, получившая название **насыщенного диска (saturated disk)**[116]. После высвобождения одного кванта АХ его концентрация возрастает практически мгновенно (в течение микросекунд) во всем объеме синаптической щели до уровня, достаточно высокого (0,5 ммоль), чтобы насытить и рецепторы АХ, и АХЭ в пре-

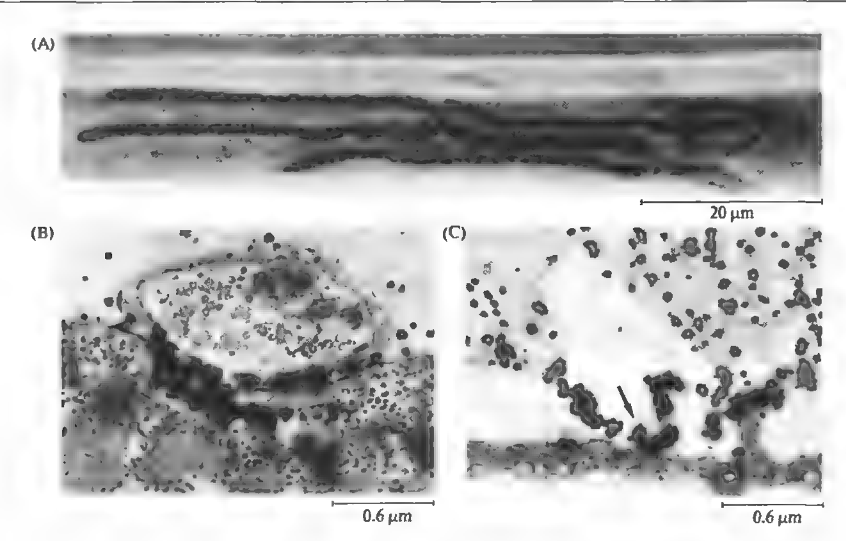


Рис. 13.22. Ацетилхолинэстераза сконцентрирована в синаптическом базальном слое нервно-мышечного контакта скелетной мышцы. (А) Микрофотография нервно-мышечного контакта кожной грудной мышцы лягушки, окрашенная гистохимически на ацетилхолинэстеразу. Темный продукт реакции располагается по синаптическим желобкам и складкам. (В) Электронная микрофотография поперечного среза аксонной терминали мышцы, окрашенной на ацетилхолинэстеразу, как на А. Электронно-плотный продукт реакции заполняет синаптическую щель и складки контакта. (С) Электронная микрофотография поврежденной мышцы. Нервное окончание, шванновская клетка и мышечное волокно дегенерировали и были фагоцитированы. Вследствие этого остается пустой футляр, образованный базальным слоем. Поврежденная мышца была окрашена на ацетилхолинэстеразу, стрелка показывает продукт реакции, связанный с синаптическим базальным слоем.

Fig. 13.22. Acetylcholinesterase Is Concentrated in the synaptic basal lamina at the skeletal neuromuscular junction. (A) Light micrograph of a neuromuscular junction in a frog cutaneous pectoris muscle stained by a histochemical procedure for acetylcholinesterase. The dark reaction product lines the synaptic gutters and junctional folds. (B) Electron micrograph of a cross section of an axon terminal from a muscle stained for acetylcholinesterase as in part A. The electron-dense reaction product fills the synaptic cleft and the junctional folds. (C) Electron micrograph of a damaged muscle in which the nerve terminal, Schwann cell, and muscle fiber have degenerated and been phagocytized, leaving only empty basal lamina sheaths. The damaged muscle was stained for acetylcholinesterase; reaction product is associated with the synaptic basal lamina (arrow). (Micrographs kindly provided by U. J. McMahan.)

делах диска диаметром примерно 0,5 мкм, центром которого является место высвобождения медиатора. Связывание АХ с рецепторами и ацетилхолинэстеразой происходит быстро, сравнимо по скорости с процессом расщепления АХ ацетилхолинэстеразой (АХЭ осуществляет ферментативный гидролиз одной молекулы АХ за 0,1 мс). Поэтому доля выброшенных из нервного окончания молекул АХ, которые взаимодействуют, прежде всего, с постсинаптическими рецепторами, определяется отношением числа рецепторов к числу молекул АХЭ. Это означает, что приблизительно 20% молекул АХ связываются с АХЭ и 80% — с ацетилхолиновыми рецепторами.

Связывание АХ с рецепторами вызывает резкое падение концентрации этого медиатора. Концентрация АХ остается низкой из-за того, что АХЭ может расщеплять АХ значительно быстрее (10 молекул/мс) чем они высвобождаются рецептором вследствие закрытия ионных каналов (τ=1 мс; глава 9). Таким образом, приблизительно через 0,1 мс после поступления АХ в синаптическую щель его концентрация в щели падает до такого уровня, что вероятность того, что найдутся хотя бы две молекулы АХ, способные связаться и открыть другой рецептор, становится минимальной.

Такой анализ позволяет высказать предположение, что ингибирование ацетилхолинэстеразы должно оказывать более выраженное влияние на длительность синаптического потенциала, чем на его амплитуду. Этот эффект наблюдается на самом деле: амплитуда повышается в 1,5–2 раза, а длительность — в 3–5 раз[117, 118]. Таким образом, устройство нервно-мышечного контакта, плотность и ки-

нетические свойства рецепторов АХ и АХЭ, взятые вместе, создают синапс, который способен очень быстро реагировать на стимул и эффективно использовать АХ.

Удаление АТФ путем гидролиза

Как и в случае АХ, действие АТФ быстро прерывается путем гидролиза[119]. Экто-АТФ-дифосфогидролаза (АДФаза или апираза) гидролизует АТФ до АДФ и АДФ до АМФ. АМФ превращается в аденозин под действием фермента экто-5′-нуклеотидазы. Оба фермента обнаружены в глиальных клетках и в местах синаптических контактов на нейронах[120, 121]. Во многих синапсах аденозин модулирует синаптическую передачу, соединяясь с рецепторами на пре- и постсинаптической клетках[122]. Действие аденозина прекращается вследствие захвата или действия аденозиндезаминазы, которая расщепляет аденозин до инозина.

Удаление медиаторов путем захвата

Действие дофамина норадреналина, глутамата, 5-НТ, глицина и ГАМК заканчивается вследствие захвата медиатора пресинаптическими нервными окончаниями, постсинаптическими клетками или глиальными клетками при помощи специальных белковых транспортеров[123, 124]. Те медиаторы, которые транспортируются в пресинаптические нервные окончания, могут быть вновь упакованы в пузырьки и использованы для синаптической передачи. Существуют два основных семейства белков-транспортеров медиаторов. Для осуществления захвата медиаторов оба используют энергию, создаваемую снижением натриевого электрохимического градиента (глава 4). Натрий- и хлор-зависимые транспортеры норадреналина (NET), ГАМК (GAT), глицина (GLYT), дофамина (DAT) и 5-НТ (SERT) имеют 12 трансмембранных доменов, внутриклеточные амино- и карбокси-концы и несколько внеклеточных мест для гликозилирования. Требующиеся для работы транспортеров внеклеточные ионы натрия и хлора транспортируются одновременно с медиатором.

Второй основной класс транспортеров медиаторов представляет семейство натрий-зависимых транспортеров анионных аминокислот[124]. Это белки, имеющие 10 трансмембранных доменов. Члены этого семейства, называемые GLAST, GLT-1, EAAC1 у крыс и EAAT1–5 у человека, прекращают действие глутамата и аспартата. Стехиометрические параметры транспорта различаются для разных членов семейства: с каждой молекулой глутамата внутрь клетки поступает два-три иона натрия и один ион калия выводится наружу, или один протон транспортируется внутрь, а один гидроксильный (или гидрокарбонатный) ион выносится за пределы клетки. Транспортеры глутамата GLAST и GLT-1 обнаружены преимущественно на клетках глии у крыс, а EAAC1 локализован на нейронах[125]. Эксперименты на мутантных мышах позволили установить, что большая часть глутамата захватывается глиальными клетками, однако для нормального функционирования системы транспорта необходимо присутствие всех трех транспортеров[126].

Транспортеры, которые переносят нейромедиаторы в нервные окончания, отличаются от тех, которые транспортируют медиаторы в синаптические пузырьки. Например, захват норадреналина в нервную терминаль блокируется кокаином, тогда как его транспорт в синаптический пузырек — резерпином. Интересное исключение представляет вещество фенфлурамин, который ингибирует транспорт 5-НТ как везикулярным транспортером, так и транспортером плазматической мембраны[127]. В результате этого 5-НТ выходит из синаптических пузырьков и накапливается в цитоплазме. Это приводит к тому, что транспортер плазматической мембраны начинает работать в обратном направлении, выводя 5-НТ из окончания.

Важное значение механизмов захвата медиаторов проявляется при воздействии лекарственных препаратов, блокирующих транспортеры нейромедиаторов[123]. Трициклические антидепрессанты, такие как дезипрамин, являются мощными ингибиторами захвата норадреналина, а некоторые новые антидепрессанты, такие как флуоксетин (Prozak), сертралин (Zoloft) и пароксетин (Paxil), являются очень сильными ингибиторами захвата 5-НТ[128]. Недостаточное удаление глутамата из внеклеточной среды в ЦНС может приводить к чрезмерной активации глутаматных рецепторов, вызывая эпилепсию, дегенерацию клеток и в некоторых случаях паралич[126].

Действие пептидных медиаторов прекращается вследствие десенситизации рецепторов и удаления пептида из внеклеточной жидкости путем диффузии и распада[129]. Доказательства обратного захвата пептидов в преси-

наптическое окончание отсутствуют. Характеристика ферментов, которые осуществляют деградацию пептидов, находится на начальном этапе[130].

Выводы

- Ацетилхолин, норадреналин, адреналин, дофамин, 5-гидрокситриптамин, гистамин, аденозинтрифосфат, γ-аминомасляная кислота, глицин и глутамат являются классическими низкомолекулярными медиаторами.
- Оксид азота и оксид углерода являются низкомолекулярными липидо- и водорастворимыми медиаторами, которые не хранятся в клетке.
- Нейропептиды образуют третью группу медиаторов.
- Многие нейроны высвобождают более одного медиатора, обычно один низкомолекулярный медиатор и один или более нейропептид.
- Классические низкомолекулярные медиаторы синтезируются в аксонных окончаниях, упаковываются в маленькие синаптические пузырьки и хранятся до высвобождения. Механизмы обратной связи контролируют количество и активность ферментов, катализирующих синтез медиатора на адекватном уровне.
- Нейропептиды синтезируются в теле клетки, упаковываются в крупные плотные пузырьки в аппарате Гольджи и транспортируются в аксонное окончание.
- Медленный аксонный транспорт переносит растворимые белки и компоненты цитоскелета из тела клетки в аксонное окончание со скоростью 1–2 мм в день.
- Быстрый аксонный транспорт переносит пузырьки и другие органеллы со скоростью до 400 мм в день либо по направлению к окончанию (антероградный транспорт), либо по направлению к соме клетки (ретроградный транспорт). Быстрый транспорт осуществляется молекулярными моторами, которые перемещают органеллы вдоль микротрубочек.
- Высоко консервативный механизм транспорта пузырьков и слияния мембран, который описывается SNARE-гипотезой, осуществляет экзоцитоз синаптических пузырьков. Синаптотагмин является кальциевым сенсором, необходимым для высвобождения медиатора.
- После высвобождения медиатора компоненты везикулярных мембран возвращаются в клетку по механизму эндоцитоза и подвергаются метаболическому круговороту.
- Сложный постсинаптический аппарат иммобилизует рецепторы медиаторов, связывая их с цитоскелетом и создавая внутриклеточную структуру для сигнальных белков, которые определяют последствия активации рецепторов.
- Заключительным шагом химической синаптической передачи является удаление медиатора из синаптической щели путем диффузии, распада или захвата медиатора. Правильное удаление медиатора является важным процессом для нормального функционирования синапса.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Bajjalieh, S. M. 1999. Synaptic vesicle docking and fusion. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 321–328.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. 1996. *The Biochemical Basis of Pharmacology*, 7th Ed. Oxford University Press, New York.
- Hilfiker, S., Pieribone, V. A., Czernik, A. J., Kao, H-T., Augustine, G. J., and Greengard, P. 1999. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 269–279.
- Hirokawa, N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279: 519–526.
- Kneussel, M., and Betz, H. 2000. Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: Novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J. Physiol.* 525: 1–9.
- Lundberg, J. M. 1996. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.* 48: 113–178.
- O'Brien, R. J., Lau, L. F., and Huganir, R. L. 1998. Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 364–369.
- Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J., and Zorzano, A. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78: 969–1054.

- Pellizzari, R., Rossetto, O., Schiavo, G., and Montecucco, C. 1999. Tetanus and botulinum neurotoxins: Mechanism of action and therapeutic uses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 259–268.
- Robinson, M. S. 1994. The role of clathrin, adaptors, and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 538–544.
- Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 389–442.
- Schuldiner, S., Shirvan, A., and Linial, M. 1995. Vesicular neurotransmitter transporters: From bacteria to humans. *Physiol. Rev.* 75: 369–392.
- Sheng, M. and Lee, S. H. 2000. Growth of the NMDA receptor industrial complex. *Nature Neurosci.* 3: 633–635.
- Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., and Uhler, M. D. (eds.). 1999. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, 6th Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Vallee, R. B., and Bloom, G. S. 1991. Mechanisms of fast and slow axonal transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 59–92.

Статьи

- Birks, R. I., and Macintosh, F. C. 1961. Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *J. Biochem. Physiol.* 39: 787–827.
- Brady, S. T., Lasek, R. J., and Alien, R. D. 1982. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 218: 1129–1131.
- Howard, J., Hudspeth, A. J., and Vale, R. D. 1989. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342: 154–158.
- Jonas, R, Bischofberger, J., and Sandkuhler,J. 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281: 419–424.
- Kuromi, H., and Kidokoro, Y. 1998. Two distinct pools of synaptic vesicles in single presynaptic boutons in a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, *shibire*. *Neuron* 20: 917–925.
- McMahan, U. J., Sanes, J. R., and Marshall, L. M. 1978. Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature* 271: 172–174.
- Nusser, Z., Mulvihill, E., Streit, R, and Somogyi, P. 1994. Subsynaptic segregation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors as revealed by immunogold localization. *Neuroscience* 61: 421–427.
- Schnapp, B. J., Vale, R. D., Sheetz, M. P., and Reese, T. S. 1985. Single microtubules from squid axoplasm support bi-directional movement of organelles. *Cell* 40: 455–462.
- Sulzer, D., Joyce, M. P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S. N., Hattori, T., and Rayport, S. 1998. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J. Neurosci.* 18: 4588–4602.

Цитированная литература

1. Elliot, T. R. 1904. *J. Physiol.* 31: (Proc.) xx–xxi.
2. von Euler, U. S. 1956. *Noradrenaline*. Charles Thomas, Springfield, IL.
3. Hall, Z. W., Hildebrand, J. G. and Kravitz, E. A. 1974. *Chemistry of Synaptic Transmission*. Chiron Press, Newton, MA.
4. Ding, R., Asada, H., and Obata, K. 1998. *Brain Res.* 800: 105–113.
5. Miele, M., Boutelle, M. G., and Fillenz, M. 1996. *J. Physiol.* 497: 745–751.
6. Perschak, H. and Cuenod, M. 1990. *Neuroscience* 35: 283–287.
7. Myers, R. D., Adell, A., and Lankford, M. F. 1998. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22: 371–387.
8. Vollenweider, F. X., Cuenod, M. and Do, K. Q. 1990. *J. Neurochem.* 54: 1533–1540.
9. Jaffe, et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 3548–3553.
10. Zakrzewska, K. E., et al. 1999. *Endocrinology* 140: 3183–3187.
11. Lundberg, J. M. 1996. *Pharmacol. Rev.* 48: 113–178.
12. Bondy, C. A., et al. 1989. *Cell. Mol. Neurobiol.* 9: 427–446
13. Homberg, U. and Hildebrand, J. G. 1989. *J. Comp. Neurol.* 288: 243–253.
14. Whim, M. D., Church, P. J., and Lloyd, P. E. 1993. *Mol. Neurobiol.* 7: 335–347.
15. Jonas, P., Bischofberger, J., and Sandkuhler, J. 1998. *Science* 281: 419–424.
16. Jo, Y. H., and Schlichter, R. 1999. *Nature Neurosci.* 2: 241–245.
17. Kaneko, T., et al. 1990. *Brain Res.* 507: 151–154.
18. Sulzer, D., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 4588–4602.
19. Birks, R. I., and MacIntosh, F. C. 1961. *J. Biochem. Physiol.* 39: 787–827.
20. Potter, L. T. 1970. *J. Physiol.* 206: 145–166.
21. Jope, R. 1979. *Brain Res. Rev.* 1: 313–344.
22. Parsons, S. M., et al. 1987. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 493: 220–233.
23. Axelrod, J. 1971. *Science* 173: 598–606.
24. Weiner, N., and Rabadjija, M. 1968. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 160: 61–71.
25. Joh, T. H., Park, D. H., and Reis, D. J. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4744–4748.
26. Zigmond, R. E., Schwarzchild, M. A., and Rittenhouse, A. R. 1989. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 415–461.
27. Nagatsu, T. 1995. *Essays Biochem.* 30: 15–35.
28. Nagatsu, T., and Ichinose, H. 1999. *Mol. Neurobiol.* 19: 79–96.

29. Boadle-Biber, M. C. 1993. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60: 1–15.
30. Hamon, M., et al. 1981. *J. Physiol. (Paris)* 77: 269–279.
31. Sandyk, R. 1992. *Int. J. Neurosci.* 67: 127–144.
32. Moeller, F. G., et al. 1996. *Psychopharmacology* 126: 96–103.
33. Voderholzer, U., et al. 1998. *Neuropsychopharmacology* 18: 112–124.
34. Roberts, E. 1986. In *Benzodiazepine/GABA Receptors and Chloride Channels: Structural and Functional Properties.* Alan R. Liss, New York, pp. 1–39.
35. Hall, Z. W., Bownds, M. D., and Kravitz, E. A. 1970. *J. Cell Biol.* 46: 290–299.
36. Martin, D. L. 1987. *Cell. Mol. Neurobiol.* 7: 237–253.
37. Erlander, M. G., et al. 1991. *Neuron* 7: 91–100.
38. Asada, H., et al. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6496–6499.
39. Laake, J. H., et al. 1999. *Neuroscience* 88: 1137–1151.
40. Bellocchio, E. E., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 8648–8659.
41. Thoenen, H., Mueller, R. A., and Axelrod, J. 1969. *Nature* 221: 1264.
42. Thoenen, H., Otten, U., and Schwab, M. 1979. In *The Neurosciences: Fourth Study Program.* MIT Press, Cambridge, MA, pp. 911–928.
43. Comb, M., Hyman, S. E., and Goodman, H. M. 1987. *Trends Neurosci.* 10: 473–478.
44. Schalling, M., et al. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4302–4305.
45. Mains, R. E., and Eipper, B. A. 1999. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, 6th Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 363–382.
46. Sossin, W. S., Fisher, J. M., and Scheller, R. H. 1989. *Neuron* 2: 1407–1417.
47. Paganetti, P., and Scheller, R. H. 1994. *Broin Res.* 633: 53–62.
48. Schuldiner, S., Shirvan, A., and Linial, M. 1995. *Physiol. Rev.* 75: 369–392.
49. Varoqui, H., and Erickson, J. D. 1997. *Mol. Neurobiol.* 15: 165–191.
50. Reimer, R. J., Fon, E. A., and Edwards, R. H. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 405–412.
51. Stevens, T. H., and Forgac, M. 1997. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 779–808.
52. Kopin, I. J. 1968. *Annu. Rev. Pharmacol.* 8: 377–394.
53. Luqmani, Y. A., Sudlow, G., and Whittaker, V. P. 1980. *Neuroscience* 5: 153–160.
54. Johnson, R. G., Jr. 1988. *Physiol. Rev.* 68: 232–307.
55. Burnstock, G. 1995. *J. Physiol. Pharmacol.* 46: 365–384.
56. Kupfermann, I. 1991. *Physiol. Rev.* 71: 683–732.
57. Dowdall, M. J., Boyne, A. F., and Whittaker, V. P. 1974. *Biochem. J.* 140: 1–12.
58. De Potter, W. P., Smith, A. D., and De Schaepdryver, A. F. 1970. *Tissue Cell* 2: 529–546.
59. Tamir, H., et al. 1994. *J. Neurochem.* 63: 97–107.
60. Stadler, H., and Kiene, M–L. 1987. *EMBO J.* 6: 2217–2221.
61. Dumoulin, A., et al. 1999. *J. Cell Sci.* 112: 811–823.
62. Sagne, C., et al. 1997. *FEBS Lett.* 417: 177–183.
63. Weiss, P., and Hiscoe, H. B. 1948. *J. Exp. Zool.* 107: 315–395.
64. Droz, B., and Leblond, C. P. 1963. *J. Comp. Neurol.* 121: 325–346.
65. Koehnle, T. J., and Brown, A. 1999. *J. Cell Biol.* 144: 447–458.
66. Grafstein, B., and Forman, D. S. 1980. *Physiol. Rev.* 60: 1167–1283.
67. Vallee, R. B., and Bloom, G. S. 1991. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 59–92.
68. Bartlett, S. E., Reynolds, A. J., and Hendry, I. A. 1998. *Immunol. Cell Biol.* 76: 419–423.
69. Kuypers, H. G. J. M., and Ugolini, G. 1990. *Trends Neurosci.* 13: 71–75.
70. Teune, T. M., et al. 1998. *J. Comp. Neurol.* 392: 164–178.
71. Inoue, S. 1981. *J. Cell Biol.* 89: 346–356.
72. Allen, R. D., Allen, N. S., and Travis, J. L. 1981. *Cell Motil.* 1: 291–302.
73. Brady, S. T., Lasek, R. J., and Allen, R. D. 1982. *Science* 218: 1129–1131.
74. Vale, R. D., and Fletterick, R. J. 1997. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 745–777.
75. Vallee, R. B., and Gee, M. A. 1998. *Trends Cell Biol.* 8: 490–494.
76. Hirokawa, N. 1998. *Science* 279: 519–552.
77 Sheetz, M. P. 1999. *Eur. J. Biochem.* 262: 19–25.
78. Howard, J., Hudspeth, A. J., and Vale, R. D. 1989. *Nature* 342: 154–158.
79. Svoboda, K., et al. 1993. *Nature* 365: 721–727.
80. Mandelkow, E., and Hoenger, A. 1999. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 34–44.
81. Baas, P. W., and Brown, A. 1997. *Trends Cell Biol.* 7: 380–384.
82. Hirokawa, N., et al. 1997. *Trends Cell Biol.* 7: 382–388.
83. Zimmermann, H., and Denston, C. R. 1977. *Neuroscience* 2: 695–714.
84. Zimmermann, H., and Denston, C. R. 1977. *Neuroscience* 2: 715–730.
85. Kopin, I. J., et al. 1968. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 161: 271–278.
86. Kuromi, H., and Kidokoro, Y. 1998. *Neuron* 20: 917–925.
87. Henkel, A. W., Lübke, J. and Betz, W. J. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1918–1923.

88. Henkel, A. W., et al. 1996. *J. Neurosci.* 16: 3960–3967.
89. De Camilli, P., and Greengard, P. 1986. *Biochem. Pharmacol.* 35: 4349–4357.
90. Hilfiker, S., et al. 1999. *Philos. Trons. R. Soc. Lond. B* 354: 269–279.
91. Llinás, R., et al. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3035–3039.
92. Bennett, M. K., and Scheller, R. H. 1994. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 324–329.
93. Ferro-Novick, S., and Jahn, R. 1994. *Nature* 370: 191–193.
94. Rothman, J. E. 1994. *Nature* 372: 55–63.
95. Gerst, J. E. 1999. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 707–734.
96. Bajjalieh, S. M. 1999. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 321–328.
97. Rettig, J., et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7363–7368.
98. Seagar, M., et al. 1999. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 289–297.
99. Pellizzari, R., et al. 1999. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 259–268.
100. Miller, T. M., and Heuser, J. E. 1984. *J. Cell Biol.* 98: 685–698.
101. Robinson, M. S. 1994. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 538–544.
102. Betz, W. J., and Bewick, G. S. 1993. *J. Physiol.* 460: 287–309.
103. Ryan, T. A., et al. 1993. *Neuron* 11: 713–724.
104. Teng, H., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 4855–4866.
105. Kavalali, E., Klingauf, J., and Tsien, R. W. 1999. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 337–346.
106. Nusser, Z., et al. 1994. *Neuroscience* 61: 421–427.
107. Luján, R., et al. 1996. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1488–1500.
108. Apel, E. D., and Merlie, J. P. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 62–67.
109. Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 389–442.
110. Petrof, B. J. 1998. *Mol. Cell. Biochem.* 179: 111–123.
111. Kneussel, M., and Betz, H. 2000. *J. Physiol.* 525: 1–9.
112. O'Brien, R. J., Lau, L. F., and Huganir, R. L. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 364–369.
113. Sheng, M. and Lee, S. H. 2000. *Nature Neurosci.* 3: 633–635.
114. McMahan, U. J., Sanes, J. R., and Marshall, L. M. 1978. *Nature* 271: 172–174.
115. Salpeter, M. M. 1987. In *The Vertebrate Neuromuscular Junction.* Alan R. Liss, New York, pp. 1–54.
116. Bartol, T. M., et al. 1991. *Biophys. J.* 59: 1290–1307.
117. Fatt, P., and Katz, B. 1951. *J. Physiol.* 115: 320–370.
118. Katz, B., and Miledi, R. 1973. *J. Physiol.* 231: 549–574.
119. Zimmermann, H., and Braun, N. 1996. *J. Auton. Pharmacol.* 16: 397–400.
120. Wang, T. F., and Guidotti, G. 1998. *Brain Res.* 790: 318–322.
121. Maienschein, V., and Zimmermann, H. 1996. *Neuroscience* 70: 429–438.
122. Brundege, J. M., and Dunwiddie, T. V. 1997. *Adv. Pharmacol.* 39: 353–391.
123. Amara, S. G., and Kuhar, M. J. 1993. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 73–93.
124. Palacín, M., et al. 1998. *Physiol. Rev.* 78: 969–1054.
125. Rothstein, J. D., et al. 1994. *Neuron* 13: 713–725.
126. Rothstein, J. D., et al. 1996. *Neuron* 16: 675–686.
127. Frazer, A., and Hensler, J. G. 1999. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, 6th Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 263–292.
128. Fuller, R. W. 1995. *Prog. Drug Res.* 45: 167–204.
129. Grady, E., et al. 1997. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2: 69–75.
130. Turner, A. J., and Tanzawa. K. 1997. *FASEB J.* 11: 355–364.

Глава 14

Нейромедиаторы в центральной нервной системе

Эта глава посвящена функциональной роли отдельных медиаторов в центральной нервной системе. Важные данные о функции медиаторов можно получить из исследований их распределения в нервной системе, эффектов веществ, влияющих на их синтез, хранение, высвобождение или действие медиаторов, а также из экспериментов, в которых белки, участвующие в этих процессах, изменены с помощью мутаций или технологии нокаута. Такие исследования дают ключ к пониманию биохимических механизмов, лежащих в основе нарушения функции нервной системы, и предлагают новые пути их терапии.

γ-аминомасляная кислота (ГАМК) обеспечивает тормозные эффекты в ЦНС с помощью трех классов рецепторов. Наиболее распространенными являются $ГАМК_A$ рецепторы. В ответ на действие ГАМК эти рецепторы увеличивают проводимость мембраны для ионов хлора. Активность $ГАМК_A$ рецепторов модулируется веществами антиконвульсантами, такими как барбитураты и бензодиазепины. Глутамат является основным возбуждающим медиатором в ЦНС. Он взаимодействует с двумя классами ионотропных рецепторов, различающихся по типу агонистов, которые могут их активировать, и по их относительной проницаемости для кальция. ГАМК и глутамат действуют также на метаботропные рецепторы.

Ацетилхолин действует как медиатор во многих отделах мозга через метаботропные мускариновые рецепторы. Кроме того, активность ЦНС модулируется через никотиновые рецепторы, расположенные в пресинаптической мембране. Базальные ядра переднего мозга осуществляют мощную и диффузную холинергическую иннервацию коры и гиппокампа. В холинергической системе базальных ядер проявляются выраженные дегенеративные изменения при болезни Альцгеймера, хотя это заболевание затрагивает и нейроны, высвобождающие другие медиаторы.

Действуя на ионотропные или метаботропные рецепторы, АТФ является модулятором или непосредственным медиатором синаптической передачи в ЦНС. Аденозин модулирует процессы передачи информации в ЦНС, взаимодействуя с метаботропными рецепторами.

Данные по исследованию болевой чувствительности вызвали значительный интерес к субстанции Р и опиоидным пептидам. Субстанция Р высвобождается первичными афферентными волокнами, которые отвечают на болевой стимул. Энкефалин, опиоидный пептид, высвобождаемый интернейронами спинного мозга, подавляет болевую чувствительность, блокируя высвобождение субстанции Р из окончаний первичных афферентов. Другие опиоидные пептиды действуют в синапсах мозга, изменяя наше восприятие боли. Помимо болевой чувствительности субстанция Р и опиоидные пептиды участвуют и в других функциях нервной системы.

Отличительной чертой распределения в ЦНС норадреналина, дофамина, адреналина, серотонина и гистамина является то, что лишь небольшое число нейронов высвобождает эти амины в качестве медиаторов. Однако эти нейроны настолько сильно разветвляются, что каждый нейрон посылает буквально тысячи отростков по всей ЦНС. Такая морфология сочетается с физиологической ролью моноамин-содержащих нейронов в модулировании синаптической активности в различных областях ЦНС, в результате чего они регулируют такие глобальные функции, как внимание, пробуждение, цикл сон-бодрствование и настроение.

Сложность и пластичность синаптических связей в центральной нервной системе создают физический субстрат поведения. Поэтому знание медиаторов, участвующих в функционировании синапса, и механизма их действия является центральным моментом для понимания деятельности мозга. Кроме того, пути синтеза и распада каждого нейромедиатора

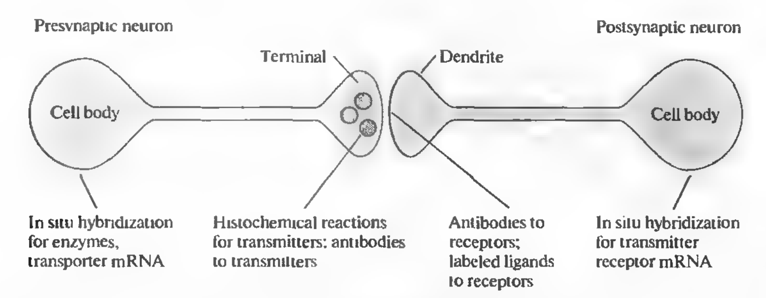


Рис. 14.1. Методы идентификации нейромедиаторов в ЦНС. Для выявления экспрессии ферментов, участвующих в синтезе или распаде медиаторов в пресинаптическом нейроне, могут быть использованы меченые антитела или нуклеотидные зонды. Сам нейромедиатор может быть обнаружен с помощью гистохимической реакции или с помощью антител к конъюгированной форме медиатора. Специфичный захват радиоактивно меченого медиатора помогает обнаруживать некоторые нейроны. Лиганды или антитела к постсинаптическим рецепторам или нуклеотидные зонды к мРНК рецепторам позволяют установить восприимчивость нейронов к конкретным медиаторам.

Fig. 14.1. Methods for Identifying Neurotransmitters in the CNS. Labeled antibodies or nucleotide probes can be used to detect the expression of enzymes involved in synthetic and degradative pathways in the presynaptic neuron. The neurotransmitter itself can be detected by chemical reaction or by antibodies to a conjugated form of the transmitter. Specific uptake of radiolabeled transmitter can identify some neurons. Ligands or antibodies to postsynaptic receptors, or nucleotide probes for receptor mRNA, provide means to identify cells sensitive to a particular transmitter.

представляют собой потенциальную мишень для фармакологических воздействий, позволяющих корректировать нарушения медиаторного баланса, возникающие при различных заболеваниях. Более широкие возможности для фундаментальных и клинических исследований появляются в связи с наличием большого разнообразия мембранных рецепторов для каждого типа медиаторов, идентифицированных с помощью методов молекулярного клонирования. Однако новые знания, полученные с помощью методов молекулярной генетики, не могут быть использованы без установления принадлежности к определенному классу нейромедиаторов, механизма действия и распределения медиаторов в центральной нервной системе.

Материал этой главы в некоторой степени повторяет информацию, представленную в главах 3 и 13. Здесь, однако, мы хотим обратить ваше внимание на типы нейронов, которые содержат различные медиаторы, и их распределение в центральной нервной системе. Начнем с методов выявления медиаторов, которые используются для картирования распределения нейронов, высвобождающих отдельные медиаторы. Эти методы суммарно представлены на рис. 14.1. Они включают визуализацию медиатора как такового, мечение одного из белков, участвующих в синтезе, действии или деградации медиатора, и выявлении мРНК для этих белков. Идентификация предполагаемых генов позволяет создавать трансгенных животных или использовать антисенс-нуклеотиды (antisense nucleotides) для блокады специфичной мРНК. Безусловно, такая информация дает возможность предлагать новые методы терапевтических воздействий для лечения дефектов центральной нервной системы с помощью методов генной инженерии и переноса генов.

§ 1. Картирование распределения медиаторов

Одним из подходов, используемых для визуализации нейронов, которые высвобождают какие-либо медиаторы в ЦНС, является картирование распределения нейронов с помощью методов гистологии или иммуногистохимии. Флуоресцентный метод Фалька и Хиллярпа[1] позволяет метить нейроны, содержащие биогенные амины, такие как дофамин, норадреналин и 5-гидрокситриптамин (5-НТ, известный также как серотонин). После конденсации с формальдегидом каждое из этих веществ при облучении ультрафиолетом начинает испускать свет с характерной длиной волны[2] (рис. 14.2). Для небольших молекул нейромедиаторов, таких как ГАМК (γ-аминомасляная кислота), 5-НТ, дофамин[3] и нейропептиды, были созданы специфичные антитела. Антитела напрямую или через

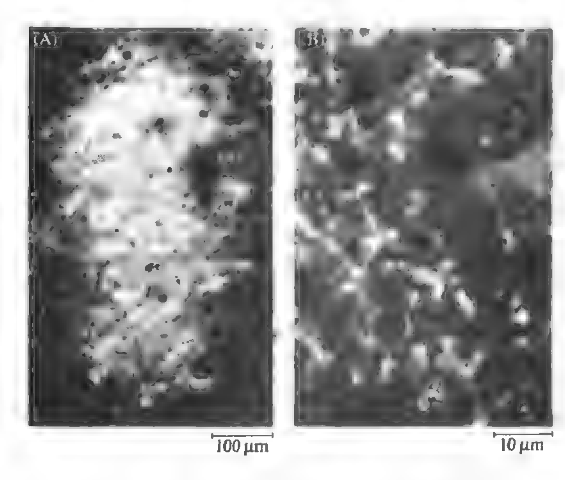


Рис. 14.2. Визуализация клеток, содержащих биогенные амины, и их терминалей с помощью вызванной формальдегидом флюоресценции. (A) Клетки, содержащие норадреналин, в голубом пятне (locus coeruleus). (B) Распределение окончаний клеток голубого пятна в гиппокампе.

Fig. 14.2. Visualization of Biogenic Amine-Containing Cells and their terminal arborizations by formaldehydeinduced fluorescence. (A) Norepinephrine-containing cells in the locus coeruleus. (B) The terminal arborizations of locus coeruleus cells in the hippocampus. (From Harik, 1984.)

промежуточные звенья соединяют с маркерами, которые могут быть обнаружены с использованием световой, флуоресцентной или электронной микроскопии. Методы клонирования кДНК нейропептидов и гибридизации *in situ* дали дополнительные возможности для идентификации нейронов, которые синтезируют нейропептиды, и для изучения регуляции экспрессии пептидов[4)].

Альтернативой методам мечения самих медиаторов является создание специфических зондов для обнаружения ферментов, осуществляющих синтез и деградацию медиаторов. Нейроны содержат большое число ферментов, катализирующих синтез тех медиаторов, которые высвобождаются данными нейронами. Например, нейроны, использующие в качестве медиатора ГАМК, имеют высокий уровень фермента декарбоксилазы глутаминовой кислоты. Антитела к этому ферменту были использованы для обнаружения ГАМК-содержащих нейронов[5, 6)]. Антитела к ферменту холинацетилтрансферазе метят холинергические нейроны[7)], в то время как антитела к тирозингидроксилазе и дофамин-β-гидроксилазе выявляют клетки, высвобождающие дофамин и норадреналин[8)]. Для многих ферментов, участвующих в синтезе нейромедиаторов, была клонирована комплементарная ДНК. Регуляция и локализация мРНК этих ферментов были изучены с использованием метода гибридизации *in situ*[9)]. Ферменты, участвующие в распаде медиатора, в меньшей степени подходят для его идентификации. В то же время при определенных условиях ферменты, разрушающие ацетилхолин и ГАМК, могут быть использованы в качестве подходящих маркеров этих медиаторов[10)—12)].

Химическая природа синапсов может быть также установлена с помощью зондов, распознающих рецепторы на постсинаптических клетках. Например, моноклональные антитела к рецепторам ГАМК были использованы для локализации синапсов, в которых ГАМК, возможно, является медиатором[13)]. С другой стороны, сам медиатор или специфичный агонист или антагонист рецепторов, содержащий радиоактивную метку, может быть использован для обнаружения рецепторов[14)—16)]. Другие методы основаны на механизмах инактивации медиаторов. Например, клетки, которые высвобождают биогенные амины или ГАМК, имеют специфичные системы обратного захвата этих медиаторов. Поэтому при инкубации ткани с радиоактивным норадреналином, дофамином, 5-НТ или ГАМК можно избирательно выделить те нервные терминали, которые высвобождают эти медиаторы.

Быстрое нарастание сведений о генах, кодирующих рецепторы нейромедиаторов, сделало возможным разработку и внедрение экспериментальных стратегий, использующих молекулярно-генетические методы. *In situ* гибридизация позволяет установить местонахождение мРНК. Полимеразные цепные реакции, осуществляемые обратной транскриптазой (reverse-transcriptase polimerase chain reaction) (RT-PCR) дают возможность амплификации продуктов идентифицированных генов. Эта реакция может быть проведена на небольших фрагментах нервной ткани или даже на единичных изолированных клетках[17)]. Можно также вывести трансгенных животных, у которых необходимый ген, предположительно кодирующий рецептор, удаляют с помощью технологии нокаута (gene "knock

out") или изменяют каким-либо другим способом. Последующее изучение поведения и физиологии таких животных дает информацию о вкладе гена-кандидата в работу синапсов. Эксперименты сходного типа могут быть выполнены и на клетках при введении в них антисенс-олигонуклеотидов в условиях *in vitro*[18]. Накоиец, мутации генов, связанных с функциями нейромедиаторов, и имеющие место в естественных условиях у людей или животных, приводят к изменениям поведения, которые позволяют сделать выводы о фуикциях продуктов, кодируемых этими генами. В случае рецептора для нейромедиатора это могут быть анатомические или функциональные изменения в отделах мозга или даже в отдельных нейронах, чувствительных к этому нейромедиатору.

ГАМК и глицин: тормозные медиаторы в ЦНС

ГАМК высвобождается в тормозных синапсах различных областей ЦНС. В серии изящных экспериментов Отсука, Ито, Обата и их коллеги установили, что клетки Пуркинье мозжечка выделяют ГАМК в качестве тормозного медиатора в синапсах, которые они образуют на клетках ствола мозга[19)–21]. В зрительной системе также получеиы морфологические и физиологические доказательства высвобождения ГАМК как медиатора (главы 19 и 20). Так, в сетчатке ГАМК обнаружена в определенных типах горизонтальных и амакриновых клеток[22)–25]. В ядрах латерального коленчатого тела некоторые клетки содержат фермент декарбоксилазу глутаминовой кислоты, синтезирующий ГАМК, а в зрительной коре определенные типы локальных тормозных нейронов содержат декарбоксилазу глутаминовой кислоты и имеют систему захвата ГАМК[26].

Местная аппликация агентов, блокирующих действие ГАМК, оказывает влияние на нейрональную сигнализацию в зрительной системе. Так, бикукуллин и пикротоксин изменяют организацию рецептивных полей ганглионарных клеток сетчатки и комплексных клеток коры (главы 19 и 20)[27, 28]. Бесспорно установлено наличие большой доли ГАМК-содержащих нейронов в центральной нервной системе. Например, в ряде областей коры больших полушарий каждый пятый нейрон высвобождает ГАМК в качестве медиатора[29]. Важность тормозных взаимодействий, опосредуемых ГАМК, для нейронной сигнализации в ЦНС в целом может быть проиллюстрирована тем фактом, что применение веществ, которые блокируют рецепторы ГАМК, таких как пикротоксин и пенициллин, приводит к возникновению судорог[30].

Вторым медиатором, осуществляющим торможение в синапсах ЦНС, особенно в тех, которые расположены в стволе головного мозга и спинном мозге, является глицин. В спинном мозге кошки и речной миноги глицин играет роль основного тормозного медиатора[31, 32]. Увеличение проводимости мембран нейронов для хлора вследствие стимуляции тормозных путей точно воспроизводится внеклеточной аппликацией глицина из пипетки. Оба тормозных медиатора — и ГАМК, и глицин — открывают хлорные каналы на мембране. Для того чтобы разделить влияние этих медиаторов на проводимость и кинетику открытых каналов, необходимо осуществить запись активности одиночных ионных каналов, активируемых этими медиаторами, или провести анализ шумов. Таким образом можно продемонстрировать, что характеристики каналов, открываемых эндогенными медиаторами в процессе синаптической активности, соответствуют характеристикам каналов, которые активируются во время аппликации экзогенного ГАМК или глицина. Простым и часто используемым методом, позволяющим разделить эффекты этих двух медиаторов, является применение веществ, блокирующих торможение, таких как стрихнин для глициновых рецепторов и пикротоксин и бикукулин для ГАМК рецепторов[33].

Ионотропный глициновый рецептор является членом суперсемейства лиганд-зависимых ионных каналов, которое включает никотиновые АХ рецепторы, рецепторы ГАМК и 5-НТ[34] (глава 3). Мутация α-субъединицы глицинового рецептора у мышей и человека приводит к возникновению нарушения двигательной функции и поведения[35, 36], что подчеркивает важное значеиие глицинергической синаптической сигнализации.

Рецепторы ГАМК

В ЦНС обнаружены три класса рецепторов ГАМК. Два из них, $ГАМК_A$ и $ГАМК_C$, являются ионотропными, а $ГАМК_B$ рецепторы — метаботропными. Идентифицированы четыре типа субъединиц $ГАМК_A$ рецепторов (глава 3): α, β, γ и δ[37, 38]. Субъединицы α и β, каждая по отдельности или в комбинации,

могут образовывать каналы в экспериментальных условиях. Каждый тип субъединиц объединяет множество различающихся между собой изоформ, поэтому разные комбинации субъединиц образуют рецепторы с разными свойствами. Распределение мРНК, кодирующей разные изоформы субъединиц рецепторов ГАМК, различается в разных отделах мозга, что предполагает наличие специфичности распределения подтипов рецепторов ГАМК в мозге[29]. Как видно на рис. 14.3, высокий уровень экспрессии подтипов субъединиц α_1 и α_6, но не α_3, наблюдается в мозжечке. Определенная комбинация субъединиц ГАМК рецептора, включающая α_1, β_2, γ_2-субъединицы, более широко распространена в нервной системе, чем другие варианты[39]. Установлено, что различный субъединичный состав рецепторов ГАМК вносит определенный вклад в фармакологическую гетерогенность нативных рецепторов[40].

В начале 1980-х годов в нейронах ЦНС были обнаружены медленные ответы на аппликацию ГАМК, нечувствительные к действию бикукуллина[41]. Такие медленные ответы вызывал баклофен, который не оказывает влияния на $ГАМК_А$ рецепторы. Этот эффект связан с активацией метаботропных $ГАМК_В$ рецепторов. Позднее был клонирован ген $ГАМК_В$ рецепторов[42, 43]. Он кодирует G-белок-сопряженный рецептор, имеющий семь трансмембранных доменов и сходный с метаботропным глутаматным рецептором (глава 10). Постсинаптические $ГАМК_В$ рецепторы активируют калиевые каналы внутреннего выпрямления (GIRK или Kir3.0)[44)–46], тогда как пресинаптические $ГАМК_В$ рецепторы подавляют активность потенциалзависимых кальциевых каналов[47].

В биполярных клетках сетчатки наблюдаются быстрые ГАМК-зависимые изменения тока хлора, подобные тем, что имеют место при активации $ГАМК_А$ рецепторов, но не чувствительные к бикукуллину (или баклофену). Рецепторы, осуществляющие этот процесс, были названы $ГАМК_С$ рецепторами[48]. Эти рецепторы фармакологически, генетически и функционально отличаются от $ГАМК_А$ рецепторов[49]. $ГАМК_С$ рецепторы особо чувствительны к аналогу ГАМК — *цис*-4-аминокротоновой кислоте. Два родственных гена (*rho1* и *rho2*) кодируют $ГАМК_С$-подобный рецептор, экспрессирующийся в ооцитах *Xenopus*[50], и субъединица rho2 была обнаружена в мозге повсеместно. Объединяясь вместе,

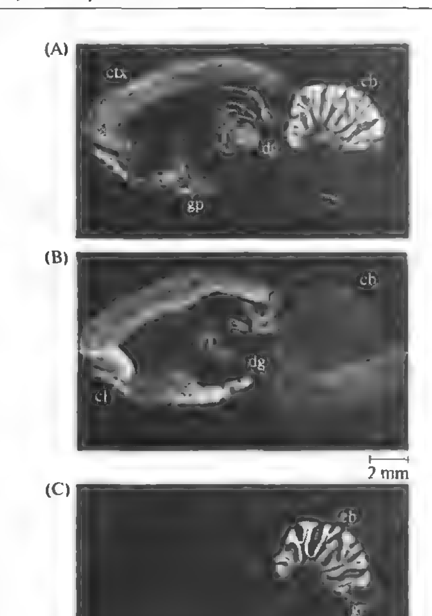


Рис. 14.3. Распределение мРНК субъединиц $ГАМК_А$ рецептора в мозге крысы. Представлены авторадиограммы серийных срезов мозга крысы, полученные с помощью *in situ* гибридизации с мечеными ^{35}S антисенс олигонуклеотидными зондами к α_1 (A), α_3 (B) и α_6 (C) субъединицы $ГАМК_А$ рецептора. cb = мозжечок; cl = claustrum; ctx = кора больших полушарий; dg = зубчатая фасция; gp = бледный шар; gr = гранулярные клетки мозжечка; T = таламус.

Fig. 14.3. The Distribution of $GABA_A$ Receptor Subunit mRNAS in the rat brain. Light-microscopic autoradiographs of serial sections of rat brain following in situ hybridization with ^{35}S-labeled antisense oligonucleotide probes for the α_1 (A), α_3 (B), and α_6 (C) $GABA_A$ receptor subunits. cb = cerebellum, cl = claustrum, ctx = cortex, dg = dentate gyrus, gp = globus pallidus, gr = cerebellar granule cells, T = thalamus. (After Luddens and Wisden, 1991; autoradiographs kindly provided by W. Wisden.)

субъединицы $ГАМК_А$ и $ГАМК_С$ рецепторов могут образовывать совершенно иной, функционально отличный класс рецепторов[51].

Модуляция функции $ГАМК_А$ рецепторов бензодиазепинами и барбитуратами

Отличительной чертой $ГАМК_А$ рецепторов является их регуляция посредством аллостерической модуляции[52]. $ГАМК_А$ рецепторы имеют места связывания как минимум для

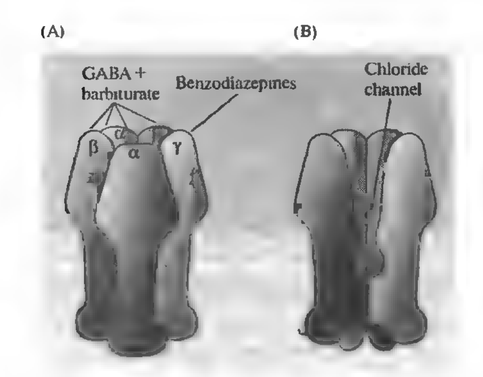


Рис. 14.4. Гипотетическая модель ГАМК$_A$ рецептора. (А) Изображен рецептор в виде $\alpha_2\beta_2\gamma$ комплекса по аналогии с никотиновым ацетилхолиновым рецептором; действительное число и состав субъединиц нативного рецептора неизвестны. ГАМК и барбитураты связываются с α и β-субъединицами, каждая из которых может образовывать функционирущий гомомультимерный рецептор; бензодиазепины связываются с γ-субъединицей. (В) Вид рецептора в поперечном разрезе.

Fig. 14.4. Hypothetical Model for the GABA$_A$ Receptor. (A) The receptor is drawn as an $\alpha_2\beta_2\gamma$ complex, by analogy with the nicotinic acetylcholine receptor; the actual number and arrangement of subunits in the native receptor is not known. GABA and barbiturates bind to the α and β subunits, each of which can form a functional homomultimeric receptor; benzodiazepines bind to the γ subunit. (B) Cross-sectional view of the receptor.

двух классов модуляторов: бензодиазепинов и барбитуратов (рис. 14.4). Бензодиазепины, к которым относят диазепам (Валиум) и хлордиазепоксид (Либриум), являются транквилизаторами и мышечными релаксантами. Барбитураты, такие как фенобарбитал и секобарбитал, являются противосудорожными препаратами. И те, и другие вещества усиливают вызванные ГАМК хлорные токи. Причем бензодиазепины увеличивают частоту открывания ионных каналов, а барбитураты продлевают время пребывания каналов в открытом состоянии[44]. Субъединицы α и β имеют места связывания и для ГАМК, и для барбитуратов (см. рис. 14.4); кроме того, экспрессия каждой из этих субъединиц в отдельности может приводить к образованию функционирующего рецептора[53]. Бензодиазепины связываются с γ_2 субъединицей. Субъединица γ должна экспрессироваться одновременно с α и β-субъединицами, для того чтобы образовался ГАМК$_A$ рецептор, чувствительный к бензодиазепинам[54]. Аффинность и специфичность каждого из мест связывания по отношению к их лигандам определяется не только внутренними свойствами субъединицы, но также ее взаимодействиями с другими субъединицами.

Предполагаемый нативный ГАМК$_A$ рецептор представляет собой пентамер, состоящий из двух α, двух β и одной γ или δ субъединиц. Следовательно, существующее разнообразие субъединиц является достаточным, чтобы образовать сотни различных рецепторов. Изучение распределения и свойств различных подтипов рецепторов и идентификация эндогенных лигандов, если таковые существуют, для мест связывания барбитуратов и бензодиазепинов являются областями активиых исследований[55]. Рецепторы ГАМК (и глутамата) в ЦНС и сетчатке также модулируются цинком[56, 57]. Цинк в высоких концентрациях присутствует в некоторых синаптических пузырьках и высвобождается в период активности нейрона.

Глутаматные рецепторы в ЦНС

Множество физиологических тестов подтверждает идею о том, что глутамат, впервые открытый как возбуждающий медиатор в нервно-мышечном контакте саранчи[58] и гигантском синапсе кальмара[59], высвобождается в качестве медиатора в возбуждающих синапсах центральной нервной системы[60]. Как было описано в главе 3, ионотропные глутаматные рецепторы могут быть сгруппированы в два крупных класса: NMDA (на основании связывания с N-метил-D-аспартатом) и не-NMDA, включающий AMPA (по связыванию с α-амино-3-гидрокси-5-изоксазолпропионовой кислотой) и каинатные рецепторы[61]. NMDA рецепторы формируют каналы, проницаемые для кальция, которые могут быть мишенью для действия ряда важных модулирующих факторов. Ионы магния блокируют ток через канал, сопряженный с NMDA рецептором. Магниевый блок может быть снят действием сильной деполяризации (глава 12)[62]–[64]. Активность NMDA рецепторов также чрезвычайно сильно зависит от наличия внеклеточного глицина, который, действуя аллостерически, способствует открыванию каналов глутаматом[65].

О роли кальция, входящего в клетку через NMDA рецепторы, в длительных изменениях сигнализации в центральных синапсах было рассказано в главе 12. Избыточный при-

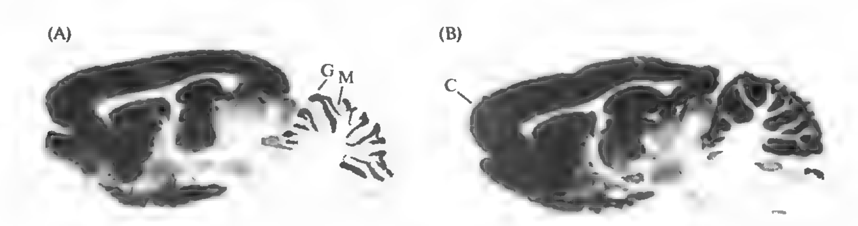


Рис. 14.5. Распределение глутаматных рецепторов в ЦНС. (A) NMDA рецепторы на авторадиограмме парасагиттального среза мозга крысы, выявленные с помощью меченного тритием глутамата (выбраны условия, при которых AMPA рецепторы не обнаруживаются). (B) Места связывания меченного тритием AMPA. AMPA и NMDA рецепторы широко распространены, и области их распределения, главным образом, перекрываются, как, например, в коре больших полушарий. Однако можно наблюдать и определенные различия: например, относительно меньшее число NMDA рецепторов наблюдается в молекулярном слое клеток мозжечка. C = кора больших полушарий; G = слой гранулярных клеток мозжечка; M = молекулярный слой мозжечка.

Fig. 14.5. The Distribution of Glutamate Receptors in the CNS. (A) NMDA receptors in a parasagittal autoradiograph of rat brain labeled by tritiated glutamate (conditions chosen so that AMPA receptors were not labeled). (B) Tritiated AMPA binding sites. AMPA and NMDA receptors are widespread and generally overlap, as in cerebral cortex. However, differences also can be seen: for example, there are relatively few NMDA receptors in the molecular layer of cerebellum. C = cerebral cortex; G = granule cell layer of cerebellum; M = molecular layer of cerebellum. (After Young et al. 1995.)

ток ионов кальция через NMDA рецепторы также является причиной нейротоксичности, наблюдающейся при различных патологиях нервной системы, включая аноксию, гипогликемию и судороги. В этих условиях уровень глутамата сохраняется на высоком уровне в течение продолжительного периода, постоянно активируя NMDA рецепторы и позволяя внутриклеточной концентрации кальция достигать цитотоксического уровня. Антагонисты NMDA рецепторов могут предотвращать такую гибель нейронов[66)].

В ЦНС глутамат используется в качестве медиатора практически повсеместно, что подтверждается данными авторадиографического исследования распределения NMDA и AMPA рецепторов (рис. 14.5). Оба типа рецепторов широко представлены в коре больших полушарий и многих подкорковых отделах мозга. В то же время имеются значительные различия в относительной доле того или иного типа рецепторов в разных отделах мозга. Например, в мозжечке клетки Пуркинье экспрессирует относительно большее число AMPA, чем NMDA рецепторов[67)]. Исследование распределения отдельных субъединиц рецепторов с помощью *in situ* гибридизации выявило еще более четкие паттерны распределения. В самом деле, селективная экспрессия подтипов AMPA рецепторов в ядрах слухового нерва в стволе мозга приводит к формированию быстрых каналов, что согласуется с той ролью, которую эти клетки играют в определении точного временного разрешения, необходимого для локализации источника звука (глава 18)[68)].

Оксид азота как медиатор в ЦНС

Биологическая активность оксида азота (NO) была впервые открыта благодаря его способности оказывать расслабляющее действие на гладкие мышцы эндотелия[68)] (глава 10). Нейрональная форма фермента, синтезирующего NO, NO-синтазы (NOC), экспрессируется в ЦНС[70)–72)]. Избыточная продукция NO является нейротоксичной и вносит определенный вклад в патогенез неврологических заболеваний[73)]. Трансгенные мыши, у которых отсутствует NOC, устойчивы к ишемии мозга[74)], а химическое повреждение дофаминергических нейронов предотвращается ингибированием NOC[75)]. Активность NOC может иметь особенно важное значение для холинергических нервных сетей в ЦНС. Содержащие NOC нейроны коры больших полушарий специфично иннервируются холинергическими нейронами базальных ядер переднего мозга[76)], которые сами содержат высокий уровень NOC.

Ацетилхолин: базальные ядра переднего мозга

Первым веществом, которое было открыто в качестве медиатора в ЦНС, был ацетилхо-

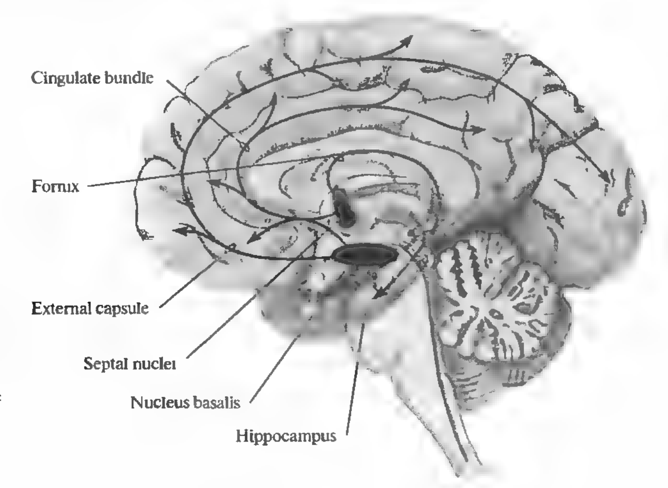


Рис. 14.6. Холинергическая иннервация коры больших полушарий и гиппокампа нейронами ядер септума и базального ядра.

Fig. 14.6. Cholinergic Innervation of the cortex and hippocampus by neurons in the septal nuclei and nucleus basalis.

лин, высвобождающийся в синапсах, образованных коллатералями спинальных нейронов на клетках Реншоу[77]. Эти синапсы, обеспечивающие быструю синаптическую передачу с участием никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, являются, однако, нетипичными. В последующих работах в различных областях мозга было продемонстрировано большое разнообразие ответов на ацетилхолин, которые осуществляются мускариновыми рецепторами. Эти ответы включают увеличение катионной проводимости мембраны, усиление или снижение проводимости для ионов калия и снижение кальциевой проводимости. Несмотря на то, что никотиновые ацетилхолиновые рецепторы несомненно экспрессируются в ЦНС (одним из примеров их существования является привыкание к курению сигарет), их синаптическую функцию определить пока довольно трудно.

Холинергические нейроны обнаружены в ядрах, разбросанных по всему мозгу, и холинергические аксоны иннервируют большинство регионов ЦНС. Наиболее известными источниками холинергического входа в кору больших полушарий и гиппокамп являются базальные ядра переднего мозга, особенно ядра септума и базальное ядро (рис. 14.6). Холинергические нейроны этих ядер имеют широко разветвленные и диффузные проекции, иннервирующие кору, гиппокамп, миндалину, таламус и ствол мозга. Повреждение базального ядра приводит к снижению уровня холинацетилтрансферазы в коре более, чем на 50%[78].

Холинергические нейроны, когнитивные функции и болезнь Альцгеймера

В исследованиях на животных и человеке было установлено, что холинергическая система имеет большое значение для когнитивных процессов, обучения и памяти[79]. Вещества, блокирующие мускариновые рецепторы, такие как атропин и скополамин, как и повреждение базального ядра, нарушают приобретение новых навыков и выполнение приобретенных форм поведения. Ингибиторы ацетихолинэстеразы, такие как физостигмин, могут улучшать выполнение задач на обучение и память и восстанавливать некоторые дефекты, возникшие вследствие повреждения базальных ядер переднего мозга. Однако такие повреждения неизбежно затрагивают клетки, высвобождающие другие медиаторы, поэтому воздействия, имеющие целью усилить функцию холинергических нейронов, лишь частично восстанавливают последствия этих повреждений. Таким образом, функция памяти осуществляется не только холинергическими нейронами, но более вероятно, что они вместе с нейронами, высвобождающими другие медиаторы, образуют один из модуляторных входов в кору и гиппокамп[80].

Интерес к роли холинергических нейронов базальных ядер в процессах обучения и памяти возрос после того, как было установлено, что снижение когнитивных способностей при старении происходит параллельно со снижением уровня фермента холинацетилтрансферазы, синтезирующего ацетил-

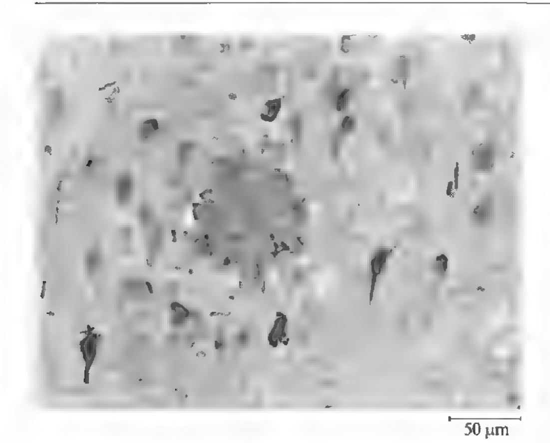


Рис. 14.7. Нейрофибриллярные сплетения и сенильные бляшки, характерные для болезни Альцгеймера. На срезе миндалины пациента с болезнью Альцгеймера среди цитологически нормальных нейронов наблюдаются поврежденные пирамидные клетки, заполненные темноокрашенными нейрофибриллярными сплетениями, образованными связками парных спиральных филаментов. Сенильная бляшка (в центре) образована крупным компактным отложением внеклеточного амилоида, окруженного короной расширенных, структурно измененных нервных отростков. Модифицированная окраска серебром по Бельшовски.

Fig. 14.7. Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques characteristic of Alzheimer's disease. Scattered among cytologically normal neurons in this section of the amygdala from an Alzheimer's patient are abnormal pyramidal cells filled with darkly staining neurofibrillary tangles, formed by the accumulation of bundles of paired helical filaments. In the center, a senile plaque con-sists of a large, compacted deposit of extracellular amyloid surrounded by a halo of dilated, structurally abnormal neurites. Modified Bielschowsky silver stain. (Mikrograph kindly provided by D. J. Selkoe.)

холин в коре больших полушарий и гиппокампе и утратой холинергических нейронов в базальных ядрах[81)]. Особенно выражены такие изменения у пациентов с болезнью Альцгеймера: наблюдается прогрессирующая нейродегенерация, вызывающая утрату памяти и когнитивных функций. Для болезни Альцгеймера характерно накопление в нейронах ЦНС нерастворимых агрегатов (нейрофибриллярных сплетений или клубков), состоящих из модифицированной формы белков, в норме связанных с цитоскелетом. Происходит также образование внеклеточных сенильных бляшек, сердцевина которых состоит из нерастворимых фибрилл, являющихся продуктом неправильного расщепления амилоидных белков. Сердцевина окружена дегенерирующими аксонами (рис. 14.7)[82, 83)]. Такие повреждения встречаются в холинергических нейронах переднего мозга и в окончаниях их аксонов в гиппокампе. Кроме того, в образцах, полученных при аутопсии базального ядра, было обнаружено существенное снижение числа холинергических нейронов. Эти изменения не отражались на числе мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, но коррелировали со снижением числа мест связывания никотина[84)].

В нейронах млекопитающих было найдено 10 субъединиц никотинового ацетилхолинового рецептора. Как считают, в ЦНС преобладающей комбинацией рецептора является пентамер, состоящий из двух α_4 и трех β_2 субъединиц. Роль генов, кодирующих эти белковые продукты, в развитии болезни Альцгеймера неизвестна. В то же время было установлено, что мутантные мыщи, у которых не функционировал ген, кодирующий субъединицу β_2, хуже выполняли задачи на ассоциативную память, и введение никотина не улучшало их поведения[85)]. Никотиновые рецепторы могут действовать как пресинаптические модуляторы в процессе высвобождения медиатора в ЦНС[86)]. Например, низкие дозы никотина усиливают синаптическую передачу в гиппокампе[87)]. Наконец, некоторые наследственные нервные болезни могут быть связаны с мутациями в генах, кодирующих субъединицы никотинового рецептора. Так, семейная форма аутосомно-доминантной ночной лобной эпилепсии, описанная в австралийских[88)] и норвежских[89)] семьях, связана с двумя разными мутациями гена, кодирующего субъединицы α_4 никотинового холинорецептора.

При болезни Альцгеймера нейрофибриллярные сплетения присутствуют не только в холинергических нейронах. Их можно обнаружить также в проекционных нейронах и нейронах локальных сетей, высвобождающих другие нейромедиаторы, такие как норадреналин, дофамин, серотонин, глутамат, ГАМК, соматостатин, нейропептид Y и субстанцию Р. Таким образом, прямые доказательства того, что только повреждение холинергических нейронов базальных ядер пе-

реднего мозга ответственны за когнитивные нарушения при болезни Альцгеймера, отсутствуют. Поэтому попытки облегчения когнитивного дефицита веществами, которые направлены только на улучшение функции холинергических нейронов, оказывают лишь частичный эффект[89].

АТФ и аденозин как медиаторы ЦНС

Аденозинтрифосфат (АТФ) обнаружен в высоких концентрациях в синаптических пузырьках. Он действует как нейромедиатор, соединяясь с одним из большого (и все увеличивающегося) числа открытых ионотропных или метаботропных **пуринергических рецепторов**[91]. Семейство из семи генов кодирует ионотропные пуринергические рецепторы, относящиеся к P2X рецепторам, которые образуют лиганд-активируемые ионные каналы[92] (глава 3). Метаботропные P2Y рецепторы сопряжены с G-белками и имеют семь трансмембранных доменов. Они кодируются восемью генами, идентифицированными к настоящему времени[93]. К пуринергическим рецепторам относятся также рецепторы, взаимодействующие с аденозином, метаболитом АТФ, который действует как модулятор синаптической передачи во многих синапсах[94, 95]. Известно, что четыре гена кодируют аденозиновые (P1) рецепторы, которые относятся к метаботропным рецепторам, сопряженным с G-белками[96].

Впервые нейромедиаторная функция АТФ и аденозина была открыта в гладкой мускулатуре. Как известно, эти пурины действуют в периферической нервной системе, в том числе в ноцицептивных афферентах[97] (глава 17), и выполняют важные функции в клетках внутреннего уха[98)—100]. Пуринергические рецепторы также обнаружены в мозге, где они осуществляют различные модуляторные воздействия и оказывают влияние на поведение. Например, у трансгенных мышей отсутствие одного типа аденозиновых рецепторов, в норме экспрессирующихся в базальных ганглиях, приводит к снижению исследовательской активности; самцы таких нокаутных мышей демонстрируют повышенный уровень агрессивности по отношению к новой незнакомой особи того же вида[101]. Первый клонированный метаботропный АТФ (P2Y) рецептор был получен из мозга цыпленка[102]. Несколько типов ионотропных (P2X) АТФ рецепторов широко представлены в мозге[103, 104], некоторые из них найдены на катехоламинергических нейронах[105], где они опосредуют пресинаптические эффекты АТФ, высвобождающегося из катехоламин-содержащих синаптических пузырьков. Кроме того, что АТФ выполняет функции синаптического модулятора в ЦНС, он действует как основной синаптический медиатор в периферических ганглиях. Антагонист P2X рецепторов сурамин блокирует спонтанные и вызванные синаптические токи в нейронах медиальной уздечки[106, 107].

§ 2. Пептидные медиаторы в ЦНС

С тех пор как в 1902 году Бейлис и Старлинг открыли в кишечнике первый гормон — секретин[108], был выделен и охарактеризован целый ряд других интестинальных гормонов. Позже было установлено, что интестинальные гормоны, такие как секретин, гастрин, брадикинин, соматостатин и холецистокинин (CCK), являются пептидами. Эти пептиды были найдены в окончаниях автономных аксонов, которые иннервируют кишечник, и в нейронах энтеральной нервной системы (глава 16). С 1950-х годов известно, что определенные нейроны в мозге могут секретировать пептидные гормоны в локальное циркуляторное русло. Например, нервные клетки гипоталамуса выделяют релизинг-факторы, которые достигают эндокринных клеток передней доли гипофиза, заставляя их секретировать другие гормоны в общий кровоток[109].

Совершенно неожиданным стало открытие в 1970-х годах того, что пептиды, обнаруженные в энтеральной нервной системе, широко распространены в головном и спинном мозге[110]. Достижения иммунологических, цитохимических и физиологических методов анализа дали возможность продемонстрировать присутствие холецистокинина, брадикинина, гастрина, вазоактивного интестинального полипептида (VIP), бомбезина (впервые выделенного из кожи лягушки Bombina bombina, упомянутой в его названии) и других кишечных гормонов в разных регионах ЦНС. Во многих случаях было показано, что пептиды могут высвобождаться вследствие стимуляции определенных отделов интактного мозга или срезов мозга[111]. Напротив, пептиды, обнаруженные сначала в гипоталамусе, позднее были найдены в кишечнике и поджелудочной железе.

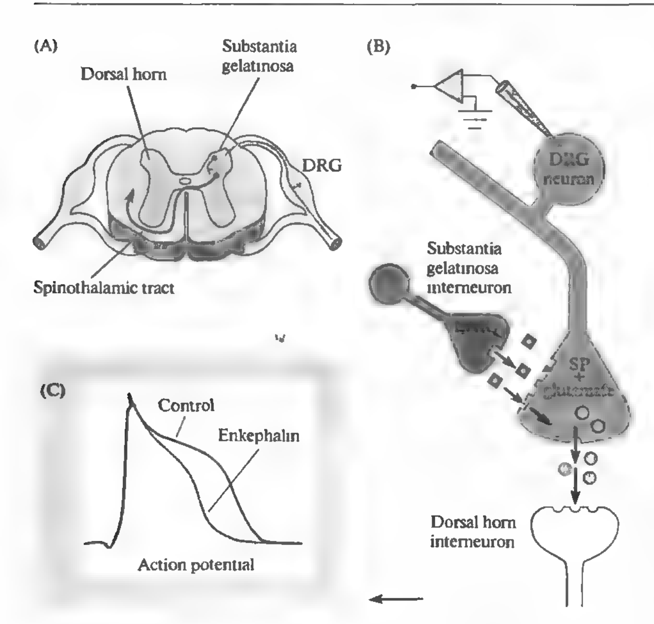


Рис. 14.8. Проводящий путь передачи ощущения боли в спинном мозге. (A, B) Клетки ганглия заднего корешка (DRG), которые отвечают на болевые стимулы, высвобождают субстанцию P (SP) и глутамат в синапсах, образованных ими на интернейронах заднего рога спинного мозга. Интернейроны желатинозной субстанции заднего рога, содержащие энкефалин (ENK), блокируют передачу, ингибируя высвобождение медиатора из окончаний клеток DRG. (C) Запись внутриклеточного отведения от клеток ганглия заднего корешка показывает, что энкефалин вызывает снижение длительности потенциала действия.

Fig. 14.8. Pathway for Transmission of Pain Sensation in the Spinal Cord. (A, B) Dorsal root ganglion (DRG) cells responding to noxious stimuli release substance P (SP) and glutamate at their synapses with interneurons in the dorsal horn of the spinal cord. Interneurons containing enkephalin (ENK) in the substantia gelatinosa of the dorsal horn block transmission by inhibiting transmitter release from terminals of DRG cells. (C) Intracellular recordings from the dorsal root ganglion cell demonstrate that enkephalin acts by causing a decrease in the duration of the action potential. (C after Mudge, Leeman, and Fischbach, 1979.)

Субстанция P

Первым намеком на идентичность пептидов центральной и энтеральной нервной системы стал медиатор, известный как субстанция P[112]. Субстанция P была впервые выделена фон Эйлером и Гаддумом в 1931 году из кишечника и мозга[113]. Они показали, что субстанция P вызывает сокращения гладкой мускулатуры. Субстанция P состоит из 11 аминокислотных остатков и является членом небольшого семейства родственных пептидов — тахикининов (также включающего нейрокинины A и B). Были установлены три рецептора нейрокининов (NK1, NK2, NK3), которые принадлежат к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белками[114]. Субстанция P выполняет функцию медиатора в окончаниях сенсорных аксонов малого диаметра дорзальных слоев спинного мозга, связанных с восприятием боли (ноцицепцией, рис. 14.8, см. также главу 18). Элиминация субстанции P или ее рецептора (NK1) у трансгенных мышей приводит к снижению болевой чувствительности[115, 116]. Нокаутные по NK1 мыши имеют сниженный уровень территориальной агрессии, которая может быть связана с нормальной экспрессией рецепторов субстанции P и нейрокинина в нервных волокнах и секреторных клетках гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси[117].

Опиоидные пептиды

Интерес к пептидам мозга еще более вырос в середине 1970-х годов после двух серий экспериментов, выполненных Костерлицем, Хьюзом, Голдштейном, Снайдером и их коллегами[118–120]. Во-первых, они обнаружили в мозге и кишечнике рецепторы, с которыми с высокой специфичностью взаимодействовал морфин. Во-вторых, им удалось найти в мозге пептиды, действие которых было сходным с действием опиатов. Первыми были охарактеризованы пентапептиды энкефалины. Один из энкефалинов известен как мет-энкефалин, а другой — лей-энкефалин, в зависимости от того, какая аминокислота расположена на карбоксильном конце пептида — метионин или лейцин. Другой ключевой находкой стало то, что опиоидные пептиды (пептиды с опиатной активностью) и их рецепторы сконцентрированы в отделах мозга, связанных с восприятием боли. Стиму-

ляция этих отделов мозга может приводить к анальгезии[121], которая снимается налоксоном, веществом, блокирующим опиатные рецепторы. В дальнейшем интерес к пептидам подстегнуло обнаружение в спинном мозге опиоидных нейронов, аксоны которых оканчиваются на терминалях, содержащих субстанцию P, предположительно участвующих в передаче ощущения боли, и то, что опиаты блокируют высвобождение субстанции P из сенсорных терминалей[122] (см. рис. 14.8).

Исследование нейронов ганглиев задних корешков спинного мозга в культуре дало ключ к пониманию того, как энкефалины блокируют высвобождение субстанции P[123]. Стимуляция этих изолированных нейронов приводит к высвобождению субстанции P. Энкефалины, благодаря взаимодействию с опиатными μ-рецепторами, блокируют высвобождение субстанции P, активируя кальций-зависимые калиевые каналы и уменьшая длительность потенциала действия[124]. Другие опиоидные пептиды связываются со вторым подтипом опиатных рецепторов, известных как κ-рецепторы. Они уменьшают высвобождение медиатора, ингибируя потенциалзависимые кальциевые каналы[125]. Оба упомянутые подтипа рецепторов и третий подтип, d-опиоидный рецептор, образуют небольшое семейство сопряженных с G-белками опиоидных рецепторов. Все эти рецепторы способствуют снижению активности аденилатциклазы, уменьшая тем самым концентрацию цАМФ[126].

Три типа опиоидных рецепторов могут взаимодействовать с большим числом известных эндогенных лигандов. Все опиоидные пептиды имеют так называемый опиоидный специфический участок на N-конце (Tyr-Gly-Gly-Phe-[Met/Leu]), соединенный с карбоксильным концом пептидами различной длины (от 5 до 31 аминокислотных остатков). Примером такого пептида является β-эндорфин, найденный в гипофизе, мозге, поджелудочной железе и плаценте. Этот пептид, состоящий из 31 аминокислотного остатка, образуется из крупной молекулы, являющейся предшественником для других гормонов, таких как кортикотропин (АКТГ)[127]. Динорфин А — пептид, состоящий из 17 аминокислотных остатков, значительно отличается от β-эндорфина по своим фармакологическим свойствам и анатомическому распределению[128].

Введение энкефалинов в мозг, либо интравентрикулярно, либо непосредственно в ядра, не только воспроизводит анальгетический и эйфорический эффекты опиатов, но и вызывает другие выраженные изменения поведения, такие как мышечная ригидность. Это свидетельствует о том, что, помимо участия в восприятии боли, энкефалины могут оказывать самостоятельное воздействие в центральной нервной системе.

§ 3. Регуляция функций центральной нервной системы биогенными аминами

Имеются четкие доказательства того, что в центральной нервной системе млекопитающих норадреналин, дофамин, 5-гидрокситриптамин (5-НТ или серотонин) и гистамин действуют в качестве медиаторов. Эти биогенные амины (глава 13) найдены в важнейших проводниках сенсорной и моторной систем, так же как и в проводящих путях, обеспечивающих высшие функции. Однако из миллиардов нервных клеток мозга человека лишь небольшое число — только тысячи клеток — содержат биогенные амины. Более того, многие клетки, содержащие эти медиаторы, собраны в кластеры в отдельных регионах ствола мозга. Аксоны нейронов, составляющих эти кластеры или ядра (которые схематически изображены на рис. 14.9–14.12) расходятся практически во все отделы мозга. В некоторых случаях эти клетки образуют синапсы, пресинаптические терминали которых располагаются точно напротив их постсинаптических мишеней; в других местах очевидных постсинаптических мишеней не наблюдается. Такая анатомическая характеристика дает возможность предположить, что важной функцией амин-содержащих нейронов является одновременная модуляция синаптической активности в различных отделах центральной нервной системы. Биогенные амины действуют через метаботропные рецепторы (единственное исключение составляет один тип серотониновых рецепторов)[129]–[131], что согласуется с их нейромодуляторной ролью.

Норадреналин: голубое пятно (locus coeruleus)

Голубое пятно представляет собой хорошую иллюстрацию анатомии и физиологии амин-

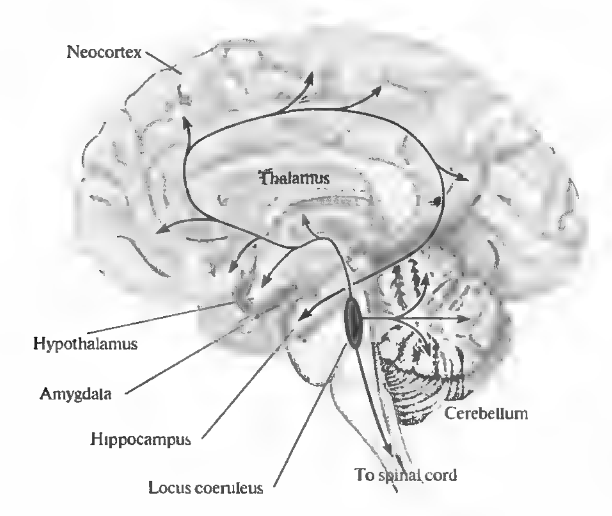


Рис. 14.9. Проекции норадреналин-содержащих нейронов голубого пятна. Голубое пятно моста расположено ниже основания четвертого желудочка. Его нейроны имеют проекции, иннервирующие различные отделы головного и спинного мозга.

Fig. 14.9. Projections of Norepinephrine-Containing Neurons in the Locus Coeruleus. The locus coeruleus lies in the pons just beneath the floor of the fourth ventricle. Neurons projecting from it innervate widespread regions of the brain and spinal cord.

содержащих клеток в центральной нервной системе[132]. Это ядро моста состоит из небольшого кластера норадреналин-содержащих клеток, которые расположены ниже основания четвертого желудочка (рис. 14.9). В центральной нервной системе крысы каждое голубое пятно (по одному ядру расположено с каждой стороны ствола мозга) содержит приблизительно 1 500 клеток. Взятые вместе, эти 3 000 нейронов составляют примерно половину всех норадреналин-содержащих клеток в мозге. Это относительно небольшое число клеток имеет множество проекций, направляет свои аксоны в мозжечок, кору больших полушарий, таламус, гиппокамп и гипоталамус. В результате всего один нейрон голубого пятна может иннервировать большие зоны и коры больших полушарий, и коры мозжечка[133].

Стимуляция голубого пятна или аппликация норадреналина оказывают разные влияния на центральные нейроны в зависимости от типа активированных в данный момент рецепторов. Например, наиболее выраженным эффектом норадреналина в пирамидных клетках гиппокампа является блокада медленной активируемой кальцием калиевой проводимости, которая лежит в основе следовой гиперполяризации, вызванной пачкой потенциалов действия[134]. Этот ответ опосредован β-адренергическими рецепторами, которые активируют аденилатциклазу, повышая уровень внутриклеточного цАМФ. Эффект блокады следовой гиперполяризации значительно увеличивает число потенциалов действия, вызываемых длительной деполяризацией.

Проекции голубого пятна образуют часть **восходящей ретикулярной активирующей системы**, функционально направленной проекции ретикулярной формации ствола мозга в высшие центры мозга. Этот путь регулирует внимание, возбуждение и циркадианные ритмы. Например, норадреналин регулирует циркадианные паттерны синтеза мелатонина в эпифизе млекопитающих[135]. Разветвленные проекции от столь небольшого числа нейронов, как в случае клеток голубого пятна, особенно хорошо подходят для выполнения такой глобальной функции.

5-HT: ядра шва (raphe nuclei)

5-гидрокситриптамин (5-HT, также известный как серотонин), как и норадреналин, локализован в нескольких ядрах ствола мозга[136]. Это ядра шва, которые расположены прямо вдоль срединной линии ствола между средним и продолговатым мозгом (рис. 14.10). (Термин “raphe” образовался от французского слова «шов».) Ядра продолговатого мозга дают проекции в спинной мозг и модулируют передачу в проводящих путях спинного мозга, участвующих в восприятии боли (глава 18), а также влияют на активность спинальных интернейронов и мотонейронов (см. следующий параграф). Ядра шва, расположенные в области среднего мозга и моста, иннервируют почти весь мозг и вместе с проекциями из голубого пятна образуют часть восходящей активирующей ретикулярной системы. Методами молекулярного клонирования были установлены 15 разных подтипов 5-HT рецепторов. Все

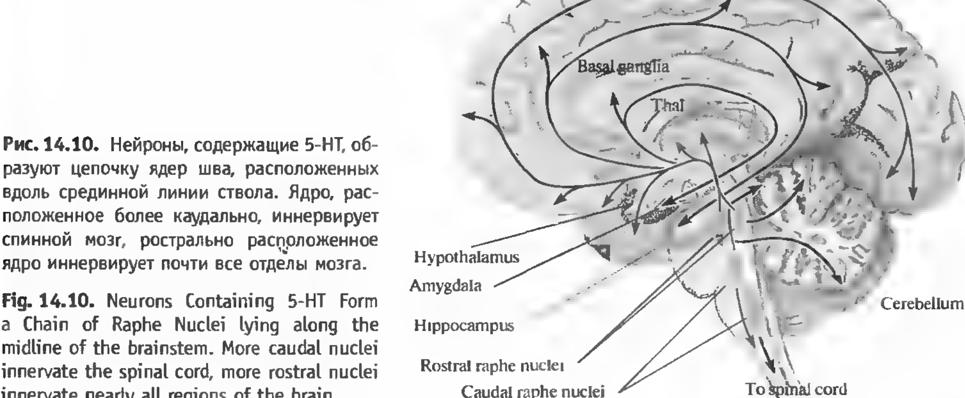


Рис. 14.10. Нейроны, содержащие 5-HT, образуют цепочку ядер шва, расположенных вдоль срединной линии ствола. Ядро, расположенное более каудально, иннервирует спинной мозг, рострально расположенное ядро иннервирует почти все отделы мозга.

Fig. 14.10. Neurons Containing 5-HT Form a Chain of Raphe Nuclei lying along the midline of the brainstem. More caudal nuclei innervate the spinal cord, more rostral nuclei innervate nearly all regions of the brain.

они принадлежат к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белками, за исключением единственного рецептора 5-HT_3, который является лиганд-активируемым ионным каналом[137].

5-HT участвует в контроле цикла сон-бодрствование. Снижение уровня 5-HT фармакологическими средствами или путем разрушения ядер шва вызывает бессонницу у кошек, которая может быть предотвращена введением 5-HT или его метаболического предшественника. Это привело к формированию «моноаминергической теории сна», одним из постулатов которой является то, что сон запускается высвобождением 5-HT[138]. Однако в последующих исследованиях было показано, что это чрезвычайно упрощенное представление о роли серотонинергических нейронов в регуляции цикла сон-бодрствование. Например, регистрация активности клеток ядер шва показала, что 5-HT-содержащие клетки увеличивают частоту своих разрядов в условиях возбуждения, но «замолкают» во время сна с быстрыми движениями глаз (REM-сон)[139]. Кроме того, серотонинергические нейроны повышают активность мотонейронов и элементов центральных генераторов паттернов движения и дыхания, расположенных в стволе мозга и спинном мозге[140]. 5-HT увеличивает возбудимость стволовых (тройничных) мотонейронов, снижая калиевую проводимость и повышая натриевую и неселективную катионную проводимость[141]. Помимо участия в процессах общего возбуждения, серотонинергические нейроны играют роль в осуществлении других форм сложного поведения, включая агрессию и формирование социальных отношений в популяции[142]. 5-HT также участвует в обеспечении когнитивных функций, модулируя холинергические нейроны[143]. LSD (диэтиламид лизергиновой кислоты), который сильно изменяет процессы восприятия у человека, воздействует преимущественно на серотонинергическую передачу[144].

Гистамин: туберомамиллярное ядро (tuberomammillary nucleus)

Гистамин был впервые открыт как естественный компонент ткани печени, легких и других органов в 1920-х годах[145]. Основным местом синтеза и высвобождения гистамина в периферических тканях являются тучные клетки. Гистамин воздействует на различные периферические ткани и участвует в разнообразных физиологических процессах, включая аллергические реакции, ответ ткани на повреждение, регуляцию желудочной секреции. Гистамин также действует в качестве нейромедиатора в мозге[146, 147]. Гистамин связывается с различными по фармакологическим свойствам типами рецепторов, два из которых (H1 и H2) недавно были клонированы[148, 149]. Эти рецепторы сопряжены с G-белками, подобно рецепторам других биогенных аминов. Действуя через H1 рецептор, гистамин вызывает деполяризацию холинергических нейронов, блокируя активные в покое калиевые ионные каналы и активируя тетродотоксин-нечувствительную проводимость для натрия[150]. В клетках нодозного ганглия (афферентах

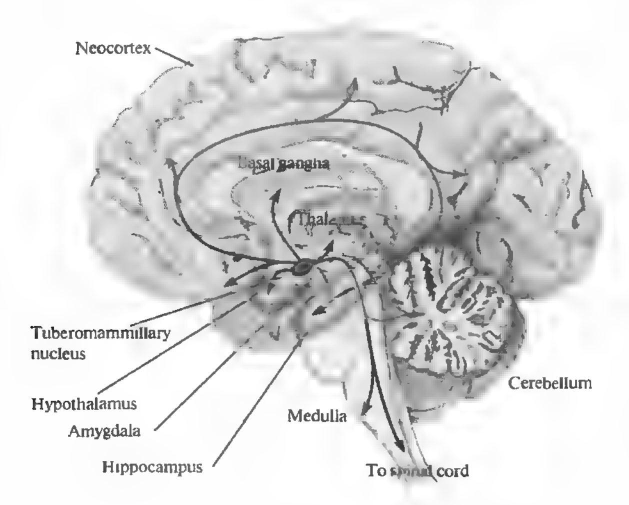


Рис. 14.11. Гистамин-содержащие нейроны расположены в туберомамиллярном ядре гипоталамуса. Эти нейроны имеют диффузные проекции в головном и спинном мозге.

Fig. 14.11. Histamine-Containing Neurons Are Localized to the Tuberomammillary Nucleus in the hypothalamus. These neurons have diffuse projections throughout the brain and spinal cord.

вагуса) активация H1 рецепторов блокирует проводимость для калия в покое и калиевые каналы, которые генерируют медленный следовой гиперполяризационный потенциал после спайка[151]. Оба эффекта способствуют повышению уровня возбудимости.

Тела гистаминовых нейронов сконцентрированы компактно в гипоталамусе, в так называемом туберомамиллярном ядре, а их аксоны расходятся практически во все отделы ЦНС[152] (рис. 14.11). Аксонные коллатерали одного гистаминового нейрона иннервируют несколько разных отделов мозга[153]. Подобно другим моноаминергическим нейронам, гистаминергические нейроны диффузно ветвятся и лишь изредка образуют классические синапсы с четкими пре- и постсинаптическими образованиями. Гистаминергические нейроны иннервируют не только нейроны, но и глиальные клетки, мелкие кровеносные сосуды и капилляры. На основе данных о морфологии гистаминергических нейронов и эффектах веществ, которые влияют на гистаминергическую передачу, можно заключить, что гистаминовые нейроны, по-видимому, регулируют общую активность мозга, а именно: состояние возбуждения и энергетический метаболизм. Механизмы этих влияний непрямые, опосредованы воздействием на другие нейроны, астроциты и кровеносные сосуды.

Дофамин: черная субстанция (substantia nigra)

В стволе мозга находятся четыре известных дофамин-содержащих ядра (рис. 14.12). Одно из них расположено в дугообразном ядре (arcuate nucleus) и посылает свои отростки в направлении срединного возвышения (median eminence) гипоталамуса, области, обогащенной пептидными релизинг-гормонами. Три другие кластера дофаминовых клеток находятся в среднем мозге; они дают проекции преимущественно в базальные ганглии, группу ядер, которые играют важную роль в контроле движений (глава 22). Как и в случае других нейронов, высвобождающих биогенные амины, здесь присутствует небольшое число клеток с сильно разветвленными проекциями. Например, у крысы в одном из кластеров среднего мозга, черной субстанции, имеется приблизительно 7 000 дофаминовых клеток. Однако каждый из этих нейронов образует примерно 250 000 варикозностей, распределенных среди их мишеней в базальных ганглиях[154].

Были клонированы пять дофаминовых рецепторов, сопряженных с G-белками. Их подразделяют на две функциональных группы в зависимости от того, как они воздействуют на аденилатциклазу: D1 и D5 увеличивают активность этого фермента; D2, D3 и D4 снижают ферментативную активность[155]. Рецепторы D1 кодируются геном, имеющим один экзон[156, 157], тогда как ген, кодирующий D2 рецепторы, может продуцировать несколько дополнительных подтипов этого рецептора путем альтернативного сплайсинга[158].

Прогрессирующая дегенерация одной из групп дофаминергических нейронов является наиболее выраженной характеристикой болезни Паркинсона. Дегенерация нейронов компактного вещества черной субстанции у па-

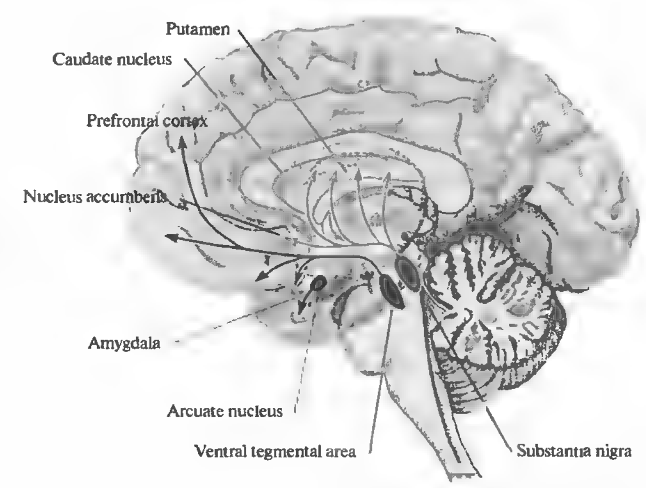


Рис. 14.12. Нейроны, содержащие дофамин, обнаружены в ядрах гипоталамуса и среднего мозга. Нейроны дугообразного (arcuate) ядра дают проекции в срединное возвышение гипоталамуса, образуя тубероинфундибулярную (tuberoinfundibular) систему. Дофаминовые нейроны черной субстанции дают проекции в хвостатое ядро (caudate nucleus) и чечевицеобразное ядро (putamen) (вместе называемые стриатум или полосатое тело) базальных ганглиев, образующие нигростриатный путь. Дофаминовые нейроны области вентральной покрышки дают проекции в прилежащее ядро (nucleus accumbens), амигдалу и префронтальную кору, образующие мезолимбическую и мезокортикальную системы.

Fig. 14.12. Neurons Containing Dopamine are found in nuclei in the hypothalamus and midbrain. Those in the arcuate nucleus project to the median eminence of the hypothalamus, forming the tuberoinfundibular system. Dopamine neurons in the substantia nigra project to the caudate nucleus and putamen (collectively called the striatum) of the basal ganglia, forming the nigrostriatal pathway. Dopamine neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens, amygdala, and prefrontal cortex, forming the mesolimbic and mesocortical systems.

циентов с болезнью Паркинсона приводит к утрате дофаминергического пресинаптического входа нейронами базальных ганглиев. Исчезновение аксонных терминалей вызывает снижение уровня дофамина в базальных ганглиях и возникновение характерных моторных нарушений: трудности инициации произвольных движений, мышечной ригидности и тремора.

Триумфом нейрофармакологии стала разработка метода замещающей терапии для лечения болезни Паркинсона. Основной идеей этого метода была попытка облегчить симптомы заболевания путем восстановления уровня дофамина в базальных ганглиях. Было известно, что дофамин сам по себе не может проникать через гематоэнцефалический барьер, поэтому больным давали предшественник дофамина — L-ДОФА. Пациенты, получавшие L-ДОФА перорально, обычно демонстрировали улучшение двигательной активности, а в образцах аутопсии мозга, взятых у пациентов, подвергавшихся лечению L-ДОФА, но умерших по иным причинам, содержание дофамина в базальных ганглиях достигало почти нормального уровня. Вероятно, при наличии высокой концентрации его предшественника, те дофаминовые нейроны, которые остались у пациентов с болезнью Паркинсона, могут синтезировать достаточное количество медиатора.

Для нервно-мышечной синаптической передачи большое значение имеют точное время и место высвобождения медиатора. С этой точки зрения, трудно представить, каким образом избыток медиатора, выделенного оставшимися терминалями, может заместить отсутствие медиатора вследствие утраты нервных окончаний, вызванной дегенерацией нейронов. Это аналогично попытке восстановить синхронное сокращение скелетной мышцы путем диффузной аппликации ацетилхолина. Однако если рассуждать с точки зрения ***нейромодуляции***, осуществляемой метаботропными рецепторами, для которой характерны медленные процессы и специфика которой определяется природой и распределением рецепторов, то можно понять, каким образом генерализованное повышение концентрации дофамина способствует восстановлению нормальной двигательной активности.

Проекции аксонов из черной субстанции в базальные ганглии не являются единственным дофаминергическим путем в центральной нервной системе. Поэтому можно ожидать, что лечение болезни Паркинсона с помощью L-ДОФА будет сопровождаться побочными эффектами вследствие нарушения баланса дофаминергических входов в другие отделы мозга. Дофамин высвобождается в отделах мозга, контролирующих настроение и эмоции, что может вызывать психи-

ческие расстройства у пациентов, принимающих L-ДОФА. С другой стороны, многие лекарства, которые назначают психиатрическим больным, по всей видимости, блокируют взаимодействие дофамина с его рецепторами, что ведет к возникновению моторных нарушений, сходных с симптомами паркинсонизма[159].

О специфичности лекарственных препаратов, действующих на синапсы

Основным вопросом при разработке новых лекарств для лечения заболеваний ЦНС является идентификация специфичности синапса не только с точки зрения типа высвобождаемого медиатора, но также с точки зрения характеристик, которые отличают этот синапс от другого, использующего тот же медиатор. Следующим шагом является создание специфичного фармакологического агента, который использует это различие. Большое разнообразие постсинаптических медиаторов создает основу для создания лекарств с высокой избирательностью. Транспортеры медиаторов, пресинаптические рецепторы и белки, участвующие в синтезе, хранении и высвобождении медиаторов, представляют собой дополнительные потенциальные мишени для лекарств.

Еще одной альтернативой системному введению лекарств (которое, к сожалению, пока разработано только на уровне эксперимента) является замещение дегенерирующих или поврежденных клеток путем трансплантации подходящих эмбриональных нейронов[160]. Как было показано, нейроны, трансплантированные в ЦНС взрослых животных, выживают и образуют синаптические связи; однако их аксоны редко отрастают более чем на несколько миллиметров (глава 24). Поэтому трансплантаты необходимо размещать в непосредственной близости от нейронов-мишеней. Другими недостатками этого подхода являются практические и этические ограничения получения эмбриональной ткани. Таким образом, необходим поиск альтернативных источников клеток для трансплантации. Такие клетки могут быть получены из плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток (глава 23). Может оказаться более подходящим использовать модифицированные вирусы или векторы для замещения генов, функции которых были нарушены в условиях заболевания, вместо замещения нейронов[161]. С помощью анализа генома можно установить регуляторные элементы, которые могут быть использованы для того, чтобы инициировать специфичную для данного типа клеток экспрессию белков, которые помогут преодолеть патологическое состояние. Несмотря на то, что существенные проблемы остаются еще нерешенными, трансплантация нейронов или метод переноса генов представляют собой перспективные средства, с помощью которых будет возможно восстановить функциональные взаимодействия в ЦНС без нежелательных побочных эффектов, нарушающих нормальную синаптическую передачу.

Выводы

- Нейроны, использующие определенный медиатор, могут быть идентифицированы по присутствию самого медиатора или ферментов, участвующих в его синтезе. Экспрессия белков, участвующих в хранении, разрушении или захвате медиатора, также может быть использована в качестве индикатора присутствия этого медиатора.
- ГАМК и глицин являются основными тормозными нейромедиаторами в головном и спинном мозге.
- ГАМК взаимодействует с тремя классами рецепторов: ионотропными $ГАМК_A$ и $ГАМК_C$ рецепторами и метаботропными $ГАМК_B$ рецепторами.
- Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в ЦНС.
- Имеется три класса глутаматных рецепторов: ионотропные рецепторы NMDA и AMPA типа и метаботропные рецепторы глутамата.
- Кальциевые сигналы, инициированные NMDA рецепторами, могут стимулировать продукцию оксида азота (NO). NO действует как диффузный нейромодулятор.
- Холинергические нейроны базального ядра и ядер септума сильно разветвляются в коре больших полушарий. Нейродегенеративные заболевания, которые характеризуются потерей памяти и когнитивных функций, характеризуются также утратой холинергических нейронов.

- Нейропептиды высвобождаются в качестве нейромедиаторов в ЦНС. Отдельные пептиды используются в разных областях нервной системы и в других системах, выполняющих различные физиологические функции.
- Относительно небольшое число клеток в ЦНС высвобождает в качестве нейромедиаторов биогенные амины (норадреналин, 5-НТ, дофамин и гистамин); тела этих нейронов образуют ядра в стволе мозга. Клетки, высвобождающие норадреналин, 5-НТ и гистамин, имеют сильно ветвящиеся отростки.
- Клетки, высвобождающие дофамин, имеют более ограниченные проекции. Нейроны дугообразного ядра посылают проекции в срединное возвышение гипоталамуса, модулируя выделение гипоталамических пептидов. Дофамин-содержащие клетки черной субстанции проецируются в базальные ганглии и влияют на двигательную активность; нейроны области вентральной покрышки посылают проекции в прилежащее ядро, миндалину и префронтальную кору, оказывая влияние на настроение и эмоции.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Betz, H. 1990. Ligand-gated ion channels in the brain: The amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5: 383–392.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. 1996. *The Biochemical Basis of Pharmacology*, 7th Ed. Oxford University Press, New York.
- Costa, E. 1998. From GABAA receptor diversity emerges a unified vision of GABAergic inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 321–350.
- Davies, R. W., Gallagher, E. J., and Savioz, A. 1994. Reverse genetics of the mouse central nervous system: Targeted genetic analysis of neuropeptide function and reverse genetic screens for genes involved in human neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiol.* 42: 319–331.
- Dunnett, S. B., Kendall, A. L., Watts, C., and Torres, E. M. 1997. Neuronal cell transplantation for Parkinson's and Huntington's diseases. *Br. Med. Bull.* 53: 757–776.
- Gotti, C., Fornasari, D., and Clementi, F. 1997. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog. Neurobiol.* 53: 199–237.
- Hollman, M., and Heinemann, S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31–108.
- Kasa, P., Rakonczay, Z., and Gulya, K. 1997. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 52: 511–535.
- Lena, C., and Changeux, J. P. 1997. Pathological mutations of nicotinic receptors and nicotine-based therapies for brain disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 674–682.
- Maggio, J. E. 1988. Tachykinins. *Annu. Rev. Neurosci.* 11: 13–28.
- Martin, A. R. 1990. Glycine- and GABA-activated chloride conductances in lamprey neurons. In O. P. Ottersen and J. Storm-Mathisen (eds.), *Glycine Neurotransmission*. Wiley, New York, pp. 171–191.
- Nicoll, R. A., Malenka, R. C., and Kauer J. A. 1990. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 70: 513–565.
- Sargent, P. B. 1993. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 403–443.
- Schuman, E. V., and Madison, D. V. 1995. Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 153–183.

Статьи

- Jonas, P., Bischofberger, J., and Sandkuhler, J. 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281: 419–424.
- Johnson, J. W. and Ascher, P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529–531.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P. J., Bischoff, S., Mickel, S. J., McMaster, G., Angst, C, Bittiger, H., Froestl, W., and Bettler, B. 1997. Expression cloning of $GABA_B$ receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386: 239–246.
- Luscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. 1997. G protein-coupled inwardly-rectifying K channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19: 687–695.
- Mains, R. E., Eipper, B. A., and Ling, N. 1977. Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3014–3018.
- McGehee, D. S., Heath, M. J., Gelber, S., Devay, P., and Role, L. W. 1995. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 269: 1692–1696.
- Nowak, L., et al. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 463–465.
- Sommer, B., Keinanen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M.,

Takagi, T., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. 1990. Flip and flop: A cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249: 1580–1585.

Von Euler, U. S., and Gaddum, J. H. 1931. Unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.* 72: 74–87.

Yu, C., Brussaard, A. B., Yang, X., Listerud, M., and Role, L. W. 1993. Uptake of antisense oligonucleotides and functional block of acetylcholine receptor subunit gene expression in primary embryonic neurons. *Dev. Genet.* 14: 296–304.

Цитированная литература

1. Falck, B., et al. 1962. *J. Histochem. Cytochem.* 10: 348–354.
2. de la Torre, J. C. 1980. *J. Neurosci. Methods* 3: 1–5.
3. Wassle, H., and Chun, M. H. 1988. *J. Neurosci.* 8: 3383–3394.
4. Mengod, G., Charli, J. L., and Palacios, J. M. 1990. Cell Mol. Neurobiol. 10: 113–126.
5. Matsuda, T., Wu, J-Y., and Roberts, E. 1973. *J. Neurochem.* 21: 159–166, 167–172.
6. Hendrickson, A. E., et al. 1983. *J. Neurosci.* 3: 1245–1262.
7. Wainer, B. H., et al. 1984. *Neurochem. Int.* 6: 163–182.
8. Miachon, S., et al. 1984. *Brain Res.* 305: 369–374.
9. Kawata, M., Yuri, K., and Sano, Y. 1991. *Comp. Biochem. Physiol. C* 98: 41–50.
10. Shute, C. C. D., and Lewis, P. R. 1963. *Nature* 199: 1160–1164.
11. Wallace, B. G., and Gillon, J. W. 1982. *J. Neurosci.* 2: 1108–1118.
12. Nagai, T., et al. 1984. In *Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS.* Vol. 3 of *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* Elsevier, Amsterdam, pp. 247–272.
13. Hendry, S. H. C., et al. 1990. *J. Neurosci.* 10: 2438–2450.
14. Kuhar, M. J., De Souza, E. B., and Unnerstall, J. R. 1986. *Annu. Rev. Neurosci.* 9: 27–59.
15. Palacios, J. M., et al. 1990. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 600: 36–52.
16. Palacios, J. M., et al. 1990. *Prog. Brain Res.* 84: 243–253.
17. Kacharmina, J. E., Crino, P. B., and Eberwine, J. 1999. *Methods Enzymol.* 303: 3–18.
18. Brussaard, A. B. 1997. *J. Neurosci. Methods* 71: 55–64.
19. Obata, K. 1969. *Experientia* 25: 1283.
20. Otsuka, M., et al. 1971. *J. Neurochem.* 18: 287–295.
21. Obata, K., Takeda, K., and Shinozaki, H. 1970. *Exp. Brain Res.* 11: 327–342.
22. Sterling, P. 1983. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 149–185.
23. Lam, D. M. 1997. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 553–556.
24. Wassle, H., et al. 1998. *Vision Res.* 38: 1411–1430.
25. Fletcher, E. L., and Wassle, H. 1999. *J. Comp. Neurol.* 413: 155–167.
26. Gilbert, C. D. 1983. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 217–247.
27. Caldwell, J. H., and Daw, N. W. 1978. *J. Physiol.* 276: 299–310.
28. Sillito, A. M. 1979. *J. Physiol.* 289: 33–53.
29. Naegele, J. R., and Barnstable, C. J. 1989. *Trends Neurosci.* 12: 28–34.
30. Olsen, R. W., and Leeb-Lundberg, F. 1981. In GABA and Benzodiazepine Receptors. Raven, New York, pp. 93–102.
31. Martin, A. R. 1990. In *Glycine Neurotransmission.* Wiley, New York, pp. 171–191.
32. Luddens, H., and Wisden, W. 1991. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 49–51.
33. Matthews, G., and Wickelgren, W. O. 1979. *J. Physiol.* 293: 393–415.
34. Zafra, F., Aragon, C., and Gimenez, C. 1997. *Mol. Neurobiol.* 14: 117–142.
35. Shiang, R., et al. 1993. *Nature Genet.* 5: 351–358.
36. Ryan, S. G., et al. 1994. *Nature Genet.* 7: 131–135.
37. Johnston, G. A. 1996. *Pharmacol. Ther.* 69: 173–198.
38. Vafa, B., and Schofield, P. R. 1998. *Int. Rev. Neurobiol.* 42: 285–332.
39. Rabow, L. E., Russek, S. J., and Farb, D. H. 1995. *Synapse* 21: 189–274.
40. Weiner, J. L., Gu, C., and Dunwiddie, T. V. 1997. *J. Neurophysiol.* 77: 1306–1312.
41. Hill, D. R., and Bowery, N. G. 1981. *Nature* 290: 149–152.
42. Kaupmann, K., et al. 1997. *Nature* 386: 239–246.
43. Bettler, B., Kaupmann, K., and Bowery, N. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 345–350.
44. Sodickson, D. L., and Bean, B. P. 1996. *J. Neurosci.* 16: 6374–6385.
45. Luscher, C., et al. 1997. *Neuron* 19: 687–695.
46. Kaupmann, K., et al. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14991–14996.
47. Ikeda, S. R. 1996. *Nature* 380: 255–258.
48. Drew, C. A., et al. 1984. *Neurosci. Lett.* 52: 317–321.
49. Lukasiewicz, P. D. 1996. *Mol. Neurobiol.* 12: 181–194.
50. Wang, T. L., Guggino, W. B., and Cutting, G. R. 1994. *J. Neurosci.* 14: 6524–6531.

51. Enz, R., and Cutting, G. R. 1998. *Vision Res.* 38: 1431–1441.
52. Costa, E. 1991. *Neuropsychopharmacology* 4: 225–235.
53. Blair, L. A. C., et al. 1988. *Science* 242: 577–579.
54. Pritchett, D. B., et al. 1988. *Science* 242: 577–579.
55. Costa, E. 1998. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 321–350.
56. Mayer, M. L., and Vyklicky, L., Jr. 1989. *J. Physiol.* 415: 351–365.
57. Qian, H., et al. 1997. *J. Neurophysiol.* 78: 2402–2412.
58. Usherwood, P. N., and Machili, P. 1969. *Nature* 210: 634–636.
59. Kawai, N., et al. 1983. *Brain Res.* 278: 346–349.
60. Fonnum, F. 1984. *J. Neurochem.* 42: 1–11.
61. Hollmann, M., and Heinemann, S. 1994. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31–108.
62. Nowak, L., et al. 1984. *Nature* 307: 463–465.
63. Mayer, M. L., and Westbrook, G. L. 1987. *Prog. Neurobiol.* 28: 197–276.
64. Johnson, J. W., and Ascher P. 1990. *Biophys. J.* 57: 1085–90.
65. Johnson, J. W., and Ascher P. 1987. *Nature* 325: 529–531.
66. Choi, D. W., Koh, J-Y., and Peters, S. 1988. *J. Neurosci.* 8: 185–196.
67. Young, A. B., et al. 1995. In *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission*. Academic Press, Harcourt, Brace and Co., New York, pp. 29–40.
68. Trussell, L. 1997. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 487–492.
69. Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. 1987. *Nature* 327: 524–526.
70. Bredt, D. S., et al. 1991. *Neuron* 7: 615–624.
71. Hope, B. T., et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2811–2814.
72. Egberongbe, Y. I., et al. 1994. *Neuroscience* 59: 561–578.
73. Dawson, V. L., and Dawson, T. M. 1998. *Prog. Brain Res.* 118: 215–229.
74. Huang, Z., et al. 1994. *Science* 265: 1883–1885.
75. Hantraye, P., et al. 1996. *Nature Med.* 2: 1017–1021.
76. Vaucher, E., Linville, D., and Hamel, E. 1997. *Neuroscience* 79: 827–836.
77. Eccles, J. C., Eccles, R. M., and Fatt, P. 1956. *J. Physiol.* 131: 154–169.
78. Muir, J. L. 1997. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56: 687–696.
79. Dunnett, S. B., and Fibiger, H. C. 1993. *Prog. Brain Res.* 98: 413–420.
80. Aigner, T. G. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 155–160.
81. Kasa, P., Rakonczay, Z., and Gulya, K. 1997. *Prog. Neurobiol.* 52: 511–535.
82. Selkoe, D. J. 1991. *Neuron* 6: 487–498.
83. Murrell, J., et al. 1991. *Science* 254: 97–99.
84. Gotti, C., Fornasari, D., and Clementi, F. 1997. *Prog. Neurobiol.* 53: 199–237.
85. Picciotto, M. R., et al. 1995. *Nature* 374: 65–67.
86. McGehee, D. S., et al. 1995. *Science* 269: 1692–1696.
87. Gray, R., et al. 1996. *Nature* 383: 713–716.
88. Steinlein, O. K., et al. 1995. *Nature Genet.* 11: 201–203.
89. Steinlein, O. K., et al. 1997. *Hum. Mol. Genet.* 6: 943–947.
90. Lena, C., and Changeux, J. P. 1997. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 674–682.
91. Burnstock, G. 1997. *Neuropharmacology* 36: 1127–1139.
92. MacKenzie, A. B., Surprenant, A., and North, R. A. 1999. Ann. N. Y. Acad. Sci. 868: 716–729.
93. Barnard, E. A., et al. 1996. *Ciba Found. Symp.* 198: 166–180.
94. Ribeiro, J. A., et al. 1996. *Prog. Brain Res.* 109: 231–241.
95. Brundege, J. M., and Dunwiddie, T. V. 1997. *Adv. Pharmacol.* 39: 353–391.
96. Palmer, T. M., and Stiles, G. L. 1995. *Neuropharmacology* 34: 683–694.
97. Burnstock, G., and Wood, J. N. 1996. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 526–532.
98. Glowatzki, E., et al. 1997. *Neuropharmacology* 36: 1269–1275.
99. Heilbronn, E., Jarlebark, L., and Lawoko, G. 1995. *Neurochem. Int.* 27: 301–311.
100. Housley, G. D. 1998. *Mol. Neurobiol.* 16: 21–48.
101. Ledent, C., et al. 1997. *Nature* 388: 674–678.
102. Webb, T. E., et al. 1993. *FEBS Lett.* 324: 219–225.
103. Kanjhan, R., et al. 1999. *J. Comp. Neurol.* 407: 11–32.
104. Shibuya, I., et al. 1999. *J. Physiol.* 514: 351–367.
105. Vulchanova, L., et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8063–8067.
106. Edwards, F. A., Gibb, A. J., and Colquhoun, D. 1992. *Nature* 359: 144–147.
107. Edwards, F. A., Robertson, S. J., and Gibb, A. J. 1997. *Neuropharmacology* 36: 1253–1268.
108. Bayliss, W. M., and Starling, E. H. 1902. *J. Physiol.* 28: 325–353.
109. Harris, G. W., Reed, M., and Fawcett, C. P. 1966. *Br. Med. Bull.* 22: 266–272.
110. Krieger, D. T. 1983. *Science* 222: 975–985.
111. Iversen, L. L., et al. 1980. *Proc. R. Soc. Lond. B* 210: 91–111.
112. Maggio, J. E. 1988. *Annu. Rev. Neurosci.* 11: 13–28.
113. Von Euler, U. S., and Gaddum, J. H. 1931. *J. Physiol.* 72: 74–87.
114. Patacchini, R., and Maggi, C. A. 1995. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 329: 161–184.

115. Cao, Y. Q., et al. 1998. *Nature* 392: 390–394.
116. De Felipe, C., et al. 1998. *Nature* 392: 394–397.
117. Culman, J., and Unger, T. 1995. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 885–891.
118. Hughes, J., et al. 1975. *Nature* 258: 577–579.
119. Teschemacher, H., et al. 1975. *Life Sci.* 16: 1771–1776.
120. Pert, C. B., and Snyder, S. H. 1973. *Science* 179: 1011–1014.
121. Fields, H. L., and Basbaum, A. I. 1978. *Annu. Rev. Physiol.* 40: 217–248.
122. Jessel, T. M., and Iversen, L. L. 1977. *Nature* 268: 549–551.
123. Mudge, A., Leeman, S., and Fischbach, G. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 526–530.
124. Werz, M. A., and Macdonald, R. L. 1983. *Neurosci. Lett.* 42: 173–178.
125. Macdonald, R. L., and Werz, M. A. 1986. *J. Physiol.* 377: 237–249.
126. Akil, H., et al. 1998. *Drug Alcohol Depend.* 51: 127–140.
127. Mains, R. E., Eipper, B. A., and Ling, N. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3014–3018.
128. Watson, S. J., et al. 1978. *Nature* 275: 226–228.
129. Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. 1996. *The Biochemical Basis of Pharmacology*, 7th Ed. Oxford University Press, New York.
130. Fillenz, M. 1990. *Noradrenergic Neurons.* Cambridge University Press, Cambridge.
131. Waterhouse, B. D., et al. 1991. *Prog. Brain Res.* 88: 351–362.
132. Foote, S. L., Bloom, F. E., and Aston-Jones, G. 1983. *Physiol. Rev.* 63: 844–914.
133. Swanson, L. W. 1976. *Brain Res.* 110: 39–56.
134. Madison, D. V., and Nicoll, R. A. 1986. *J. Physiol.* 372: 245–259.
135. Stehle, J. H., et al. 1993. *Nature* 365: 314–320.
136. Steinbusch, H. W. M. 1984. In *Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS.* Vol. 3 of *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* Elsevier, New York, pp. 68–125.
137. Gerhardt, C. C., and van Heerikhuizen, H. 1997. *Eur. J. Pharmacol.* 334: 1–23.
138. Jouvet, M. 1972. *Ergeb. Physiol.* 64: 166–307.
139. Jacobs, B. L., and Fornal, C. A. 1991. *Pharmacol. Rev.* 43: 563–578.
140. White, S. R., et al. 1996. *Prog. Brain Res.* 107: 183–199.
141. Hsiao, C. F., et al. 1997. *J. Neurophysiol.* 77: 2910–2924.
142. Raleigh, M. J., et al. 1991. *Brain Res.* 559: 181–190.
143. Cassel, J-C., and Jeitsch, H. 1995. *Neuroscience* 69: 1–41.
144. Aghajanian, G. K. and Marek, G. J. 1999. *Neuropsychopharmacology* 21 (2 suppl.): 16s–23s.
145. Douglas, W. W. 1980. In *Goodman and Gilman's The Pharmacoiogical Basis of Therapeutics.* Macmillan, New York, pp. 608–618.
146. Prell, G. D., and Green, J. P. 1986. *Annu. Rev. Neurosci.* 9: 209–254.
147. Wada, H., et al. 1991. *Trends Neurosci.* 14: 415–418.
148. Gantz, I., et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 429–433.
149. Yamashita, M., et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11515–11519.
150. Gorelova, N., and Reiner, P. B. 1996. *J. Neurophysiol.* 75: 707–714.
151. Jafri, M. S., et al. 1997. *J. Physiol.* 503: 533–546
152. Panula, P., et al. 1990. *Neuroscience* 34: 127–132.
153. Kohler, C., et al. 1985. *Neuroscience* 16: 85–110.
154. Yurek, D. M., and Sladek, J. R., Jr. 1990. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 415–440.
155. Missale, C., et al. 1998. *Physiol. Rev.* 78: 189–225.
156. Dearry, A., et al. 1990. *Nature* 347: 72–76.
157. Sunahara, R. K., et al. 1990. *Nature* 347: 80–83.
158. Monsma, F. J., et al. 1989. *Nature* 342: 926–929.
159. Baldessarini, R. J., and Tarsy, D. 1980. *Annu. Rev. Neurosci.* 3: 23–41.
160. Dunnett, S. B., et al. 1997. *Br. Med. Bull.* 53: 757–776.
161. Horellou, P., and Mallet, J. 1997. *Mol. Neurobiol.* 15: 241–256.

Раздел III

ИНТЕГРАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Глава 15

Клеточные механизмы интеграции и поведения у пиявок, муравьев и пчел

Эксперименты, выполненные на беспозвоночных, внесли существенный вклад в понимание клеточных и молекулярных механизмов нейронной сигнализации. Благодаря простой нервной системе, беспозвоночные, такие как мухи, пчелы, муравьи, черви, улитки и ракообразные, являются удобными объектами для изучения того, каким образом в нервной системе происходит интеграция информации и формирование целенаправленного поведения.

Наглядным примером является ЦНС пиявки. У пиявки можно различить отдельные нейроны, изучить их биофизические свойства, проследить контакты нейронов и определить роль идентифицированных нейронов в интегративных поведенческих актах, таких как рефлексы плавания или уклонение от препятствий. ЦНС пиявки состоит из 21 стереотипного ганглия, в каждом из которых находится около 400 нейронов. Индивидуальные сенсорные нейроны, мотонейроны и интернейроны могут быть идентифицированы как визуально, так и электрофизиологически. Каждая механосенсорная клетка в ганглии, реагирующая на прикосновение, давление или болевую стимуляцию, иннервирует определенную зону поверхности тела. Сенсорные клетки передают информацию к вставочным и двигательным нейронам через химические и электрические синапсы. После повторной стимуляции с физиологической частотой передача в сенсорных нейронах блокируется в точках ветвления аксонов. Это связано с тем, что тонкие аксоны в местах ветвления образуют дочерние отростки, бóльшие по размерам, чем материнская ветвь. Этот механизм способен обеспечить временную изоляцию чувствительных клеток. Изучая нейронные связи беспозвоночных, можно, кроме того, изучать, каким образом отдельные нейроны образуют синаптические контакты во время развития нервной системы или в процессе регенерации нейронов после повреждения.

Муравьи и пчелы способны к сложным поведенческим реакциям. Это представляет для исследователя заманчивую возможность, изучая поведение этих беспозвоночных, понять принципиальные механизмы интеграции информации в нервной системе. Так, можно проследить связь между поведением животного и физиологической активностью мозга, рассмотрев при этом, как себя ведут отдельные идентифицированные нейроны. Анализируя путь, пройденный муравьем или пчелой, можно попытаться понять всю систему от свойств фоторецепторов до нейронных сетей, которые в целом обеспечивают подобное поведение. Например, пустынные муравьи мигрируют на длинные дистанции в поисках пищи. Во время поиска муравей движется зигзагом, «маятникообразно», однако после того, как источник пищи найден, муравей разворачивается и следует по направлению к гнезду наикратчайшим путем. Его ЦНС учитывает все движения вправо и влево, выполненные муравьем во время поиска пищи, рассчитывает его текущее положение относительно исходной точки и находит кратчайший путь к ней.

Это возможно только при помощи точных координат, рассчитанных на основе поляризованного света солнца. Глаз пустынного муравья содержит особую группу фоторецепторов, способных воспринимать поляризованный свет. Эти фоторецепторы обеспечивают ЦНС информацией, необходимой для учета движений в пространстве и расчета нового вектора движения. Муравьи и пчелы являются примером того, как нервная система беспозвоночных при помощи относительно небольшого количества нейронов способна выполнять довольно сложные расчеты. Благодаря большому разнообразию нервных систем беспозвоночных, они являются излюбленным объектом для изучения клеточных механизмов поведения.

В этой книге мы не раз обращались к нейронам беспозвоночных для того, чтобы проиллюстрировать фундаментальные механизмы нейронной сигнализации. Так, например, при помощи большого по размерам аксона кальмара и его гигантского синапса были открыты универсальные законы проведения потенциала действия и принципы синаптической передачи. Клетки других беспозвоночных были использованы для того, чтобы проиллюстрировать пассивные электрические свойства мембран и механизмы ингибирования синаптической передачи.

Выбор беспозвоночных в качестве объектов исследований часто связан с методическими проблемами. Ряд технических проблем может быть проще разрешен с использованием нервной системы беспозвоночных. Во-первых, поскольку индивидуальные нервные клетки у них достаточно большие, то их можно использовать как для электрофизиологических, так и для молекулярно-биологических экспериментов. Во-вторых, хотя у беспозвоночных выработка определенного типа поведения требует определенных усилий, но оно всегда высокостереотипно, воспроизводимо и довольно легко может быть проанализировано. В-третьих, благодаря генетическим манипуляциям, плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*) и нематода *Caenorhabditis elegans*[1] сыграли большую роль в изучении механизмов развития нервной системы. Эти механизмы остались настолько консервативными в процессе эволюции, что гены, кодирующие рецепторы или ионные каналы, имеют поразительно сходные последовательности у мух, червей и высших позвоночных (главы 13 и 23). Например, у человека, так же как у дрозофилы или пиявки, гомеобоксные гены ответственны за развитие сегментов туловища, основных отделов мозга и специализированных органов, таких как глаза[2, 3].

В то же самое время надо подчеркнуть, что любопытство исследователей при изучении нервной системы беспозвоночных не ограничивается только изучением тех принципов, которые в дальнейшем можно использовать для понимания организации нервной системы высших животных или человека. То, каким образом пиявка осуществляет плавательные движения, муравей ориентируется в пространстве, пчела «танцует», сверчок «поет» или мухи летают, все это является само по себе удивительно интересной проблемой.

§ 1. От нейрона к поведению и обратно

Беспозвоночные предоставляют возможность проследить путь развития нейрона от рождения отдельной клетки до образования отростков и формирования связей. На подходящем беспозвоночном с большими нейронами можно проанализировать биофизические свойства отдельных клеток и наблюдать, как формируется координированное поведение всего организма. Аналогично можно изучать реакции на молекулярном уровне в клетках при изменении поведения животного в ответ на внешние влияния и заложенные внутренние программы. Подобного рода анализ возможен благодаря тому, что поведенческие реакции беспозвоночных высокостереотипны и осуществляются при участии относительного небольшого числа нейронов, в то время как подобные реакции у млекопитающих требуют участия тысяч нейронов.

Каждый вид нервной системы беспозвоночных имеет определенные преимущества для изучений той или иной проблемы. Нейронные сети, ответственные за элементы координированного поведения, такие как позные рефлексы, кормление, суточные ритмы, реакции избегания и плавание, были изучены на речных раках и улитках[4, 5]. ЦНС насекомых была использована для изучения различных проблем, включая развитие и регенерацию НС, полет и перемещение по земле, ориентацию в пространстве и коммуни-

кация при помощи звуков[6)–9)]. Количество видов беспозвоночных и спектр решаемых проблем настолько велики, что практически невозможно сделать общий обзор данной темы. К примеру, написано большое количество монографий о моллюске *Aplysia*, пиявках, морской улитке *Hermissenda*, речных раках и изолированных культурах нервных клеток беспозвоночных[10)–14)].

Для дальнейшего обсуждения мы выбрали нервные системы трех беспозвоночных. Пиявка, с ее примитивным поведением, стереотипным строением и функциями ЦНС и небольшим количеством нервных клеток, позволяет детально изучить свойства, связи и функции отдельных нервных клеток. У пчел же и муравьев изучение начинается с их коллективного поведения, что позволило подробно исследовать механизмы, позволяющие данным насекомым ориентироваться в пространстве, используя поляризованный свет и магнитные поля.

§ 2. Интеграция информации отдельными нейронами в ЦНС пиявки

Со времен Древней Греции и Рима пиявки использовались врачами для лечения больных, страдающих такими заболеваниями, как эпилепсия, стенокардия, туберкулез, менингит и геморрой — довольно неприятное лечение, которое почти всегда приносило больше вреда, нежели пользы несчастным жертвам. К XIX веку использование медицинских пиявок приняло такой масштаб, что они практически исчезли в Западной Европе. Поэтому Наполеон был вынужден импортировать около 6 миллионов пиявок в год из Венгрии для лечения своих солдат. Эта «мания» хирудотерапии принесла свои определенные плоды: использование пиявок в медицине способствовало изучению их размножения, развития и анатомии. В конце XIX века основатели экспериментальной эмбриологии, такие как, например, Уитман, выбрали именно пиявку для того, чтобы проследить судьбу ранних эмбриональных клеток. Аналогичным образом их НС была тщательно изучена плеядой выдающихся анатомов, включая Рамон-и-Кахаля, Санчеса, Гаскелла, Дель Рио Хортега, Одури и Ретциуса[15)]. Затем интерес к пиявкам упал и вновь появился в 1960 году, когда Стивен Куффлер и Давид Поттер[16)] впервые применили современные нейрофизиологические методики для изучения свойств ее НС. Это способствовало началу интенсивного изучения ее развития[17, 18)], биофизики и молекулярной биологии[19)–22)], нервных связей и поведения[23)–25)].

Нервные клетки муравьев и пчел меньше по размеру и более трудны для изучения. Тем не менее, используя высокоточные наблюдения и эксперименты, можно раскрыть клеточные и интегративные механизмы, лежащие в основе их поведения. Именно таким образом стало возможно анализировать механизмы восприятия информации, используемые при решении задач высокой сложности муравьями и пчелами. Такой задачей является обнаружение удаленной цели и затем поиск кратчайшего пути обратно к гнезду. Системный подход к клеточной нейробиологии возможен только при подобного рода анализе: от поведения к мозгу, от целого мозга к отдельному нейрону. В следующих главах, которые посвящены сенсорным механизмам, восприятию и двигательной координации в ЦНС млекопитающих, мы вновь увидим, что отправной точкой в исследованиях клеточных механизмов является именно поведение (например, локация источника звука в пространстве).

Ганглии пиявки: полуавтономные единицы

Тело и НС пиявки сегментировано и состоит из большого числа стереотипных повторяющихся единиц (сегментов), которые имеют сходное строение. Каждый сегмент иннервируется стереотипно устроенным ганглием, все ганглии имеют близкое строение. Даже специализированный головной и хвостовой «мозг», изображенный на рис. 15.1, состоит из слившихся ганглиев, и в нем легко прослеживаются многие свойства, характерные для сегментарного ганглия[26)].

Каждый ганглий состоит примерно из 400 нейронов, которые имеют определенную форму, размер, расположение и ветвление (branching pattern). Ганглий иннервирует определенную зону тела посредством парных нервов, а также соединяется с соседними и удаленными частями НС посредством дополнительных пучков волокон (коннектив). Интеграция информации осуществляется последовательно на следующих хорошо различимых этапах:

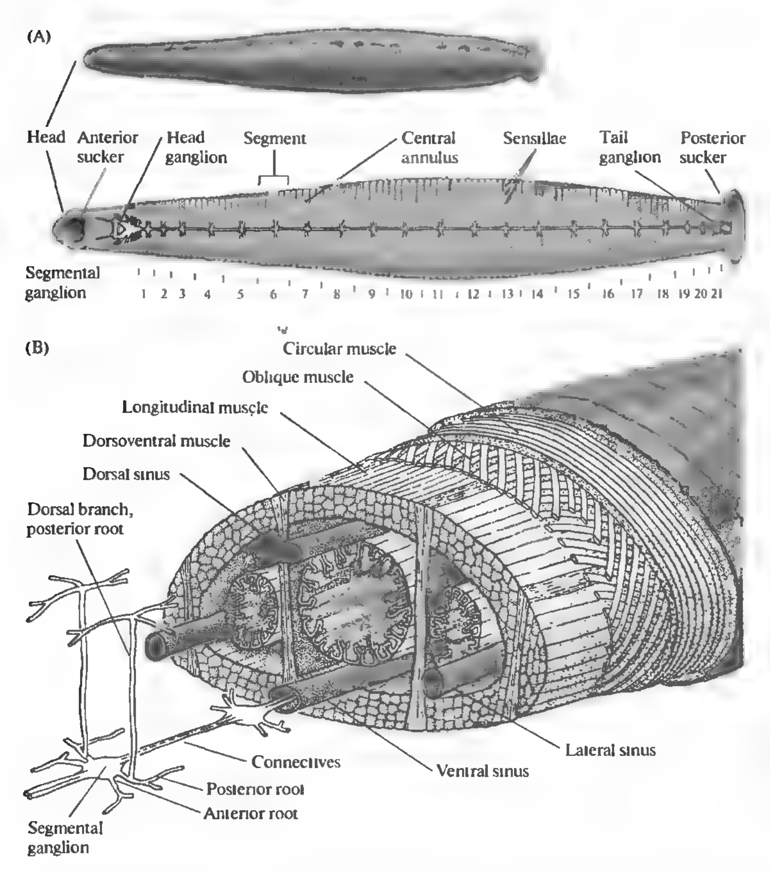


Рис. 15.1. ЦНС пиявки. (А) ЦНС пиявки представлена цепочкой из 21 сегментарного ганглия, головного и хвостового ганглия («мозг»). Каждый сегмент тела образован пятью круговыми кольцами; центральное кольцо содержит нервные окончания сенсорных органов, чувствительных к свету и прикосновению (сенсиллы). (В) Нервная цепочка находится в вентральной части тела, в брюшной лакуне. Ганглии, соединенные друг с другом пучками аксонов (коннектив), парными корешками иннервируют стенку тела. Мышцы образуют три основных слоя: циркулярный, косой и продольный. Кроме того, имеются дорзовентральные мышцы, сокращение которых уплощает пиявку, а также мышечные волокна непосредственно под кожей, образующие при сокращении складки.

Fig. 15.1. Central Nervous System of the Leech. (A) The CNS of the leech consists of a chain of 21 segmental ganglia, a head ganglion, and a tail ganglion. Over most of the body, five circumferential annuli make up each segment; the central annulus is marked by sensory end organs responding to light and touch (the sensillae). (B) The nerve cord lies in the ventral part of the body within a blood sinus. Ganglia, which are linked to each other by bundles of axons (the connectives), innervate the body wall by paired roots. The muscles are arranged in three principal layers: circular, oblique, and longitudinal. In addition, there are dorsoventral muscles that flatten the animal, and fibers immediately under the skin that raise it into ridges.

1. Каждый сегментарный ганглий получает информацию от кольцевидного участка тела, который им регулируется.
2. Соседние ганглии влияют друг на друга посредством прямых связей.
3. Координированная работа всей нервной трубки и всего червя регулируется терминальными ганглиями, расположенными на обоих концах тела.

Наверное, самое привлекательное в изучении пиявок — это то, как нервный ганглий выглядит под микроскопом, когда отдельные нейроны хорошо различимы и имеют удивительно сходное строение от сегмента к сегменту, от особи к особи, от вида к виду (рис. 15.2). Глядя на это скопление клеток, расположенных в строгом порядке, нельзя не удивиться: каким образом они, эти отдельные клетки, образуют «мозг» и способны регулировать движение животного, остановки, уклонение от препятствий, спаривание, кормление и чувствительность? Кроме эстетического удовольствия от препарата, можно получить и интеллектуальное, раскрывая структуру связей и логику хорошо организованной НС на основе свойств отдельных клеток.

Прежде чем узнать, каким образом пиявка осуществляет свои движения, необходимо изучить отдельные клетки: их свойства, соединение и функции.

Рис. 15.2. Сегментарный ганглий пиявки (вид с вентральной стороны). Отдельные клетки четко различимы. Буквами отмечены: три клетки, отвечающие на прикосновение (T), пара клеток, реагирующих на давление (P) и болевую (N) механическую стимуляцию. Каждый тип сенсорных клеток отвечает на раздражение собственными потенциалами действия, показанными ниже. Импульсы T клеток короче и меньше, чем в P и N клетках. Над сигналами показан уровень тока, пропускаемого через клетки при помощи микроэлектродов. Клетки, расположенные на задней поверхности ганглия, обведенные в кружок, являются AE мотонейронами. S нейрон представлен небольшим непарным нейроном, связанным со своими гомологами в соседних ганглиях. Этот нейрон принимает участие в рефлексах избегания у пиявки.

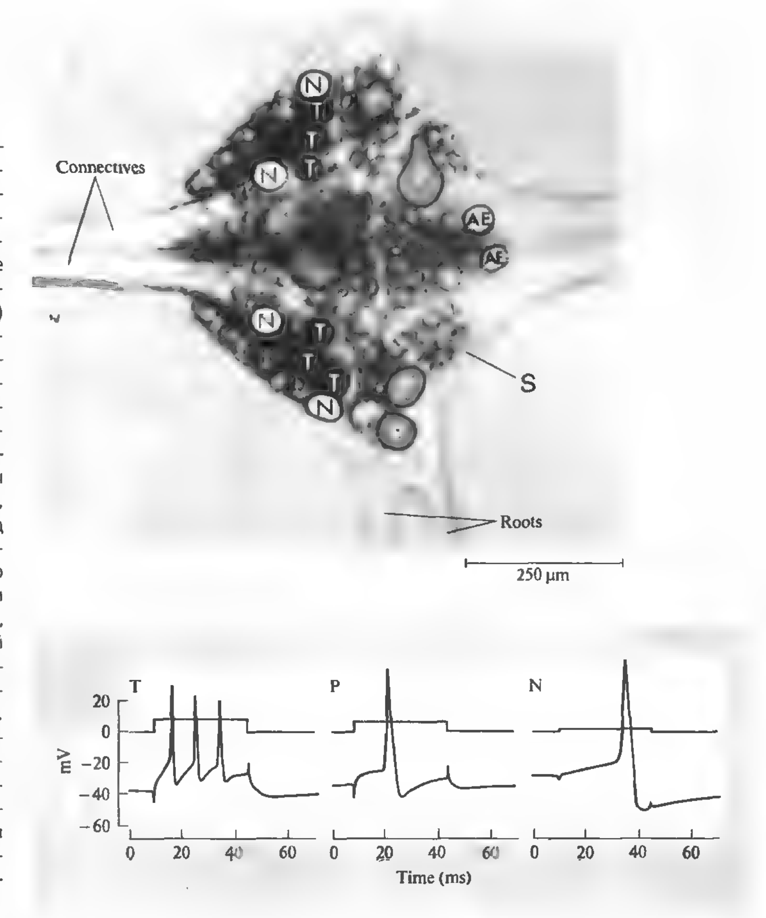


Fig. 15.2. Ventral View of Leech Segmental Ganglion. Individual cells are clearly recognized. The three sensory cells responding to touch (T) and the pairs of cell types responding to pressure (P) or noxious (N) mechanical stimulation of the skin are labeled. Each type of cell gives distinctive action potentials, as shown by the traces below. Impulses in T cells are briefer and smaller than those in P or N cells. Current injected into cells through the microelectrode is monitored on the upper traces. The cells outlined in the posterior part of the ganglion are the annulus erector (AE) motoneurons. The S cell is a small unpaired neuron that is connected to its homologues in neighboring ganglia and plays a part in escape reflexes of the animal. (After Nicholls and Baylor, 1968; Stuart, 1970.)

Сенсорные клетки в ганглиях пиявки

Когда кто-то задевает, давит или прищипывает кожу пиявки, она отвечает серией движений. Один или несколько сегментов резко сокращаются, на поверхности появляется серия четко различимых складок. Затем пиявка изгибается, разворачивается и уплывает прочь.

Отдельные сенсорные и моторные клетки можно отличить друг от друга по форме, размеру, расположению и электрическим характеристикам[27)–29)]. На рис. 15.2 показано распределение отдельных сенсорных клеток, мотонейронов и интернейронов в ганглиях пиявок. 14 нейронов, помеченных T, P и N на рис. 15.2, являются чувствительными по 3-м основным сенсорным модальностям. Каждая из клеток избирательно отвечает на прикосновение (T), давление (P) или ноцицептивную (N) — механическую стимуляцию кожи. Рис. 15.3 иллюстрирует ответы чувствительных клеток на различные кожные раздражители. T клетки на легкое прикосновение к поверхности кожи отвечают бы-

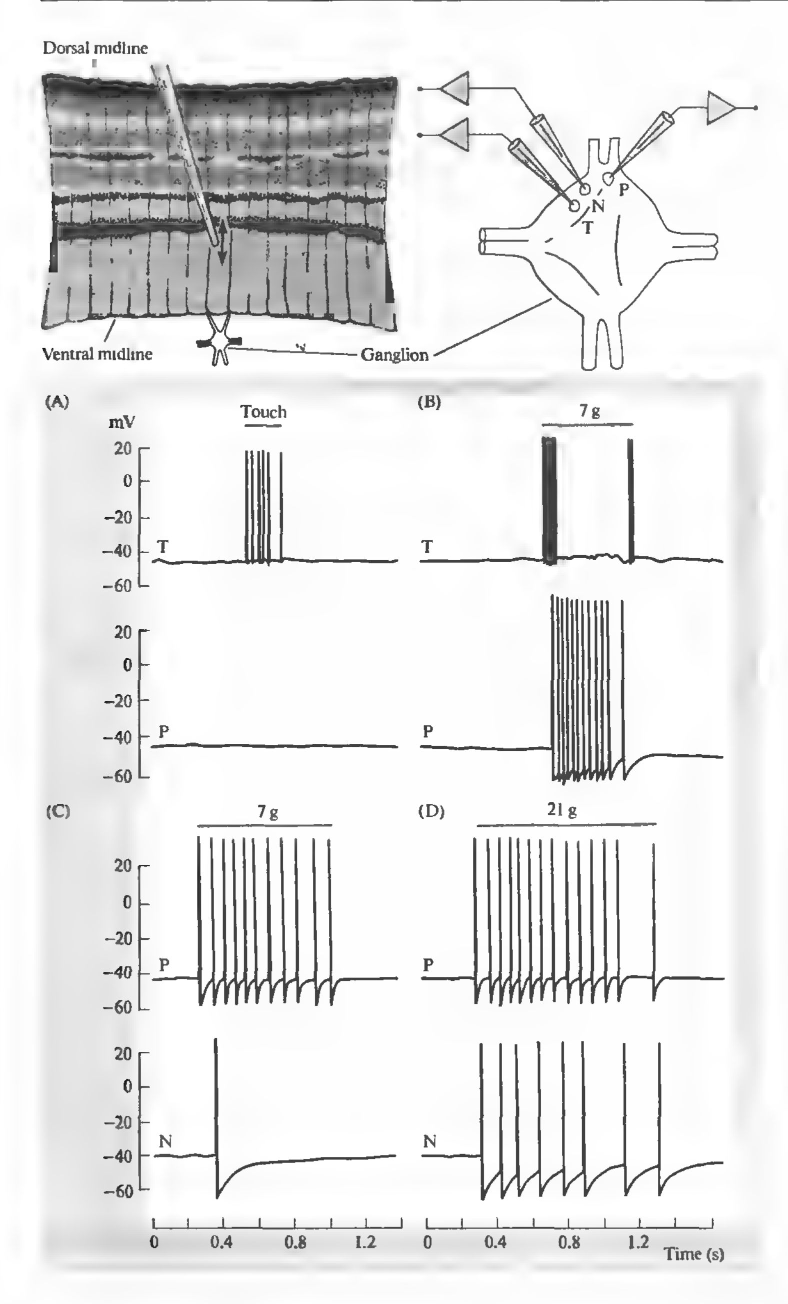


Рис. 15.3. Сигналы сенсорных клеток пиявки в ответ на кожную стимуляцию. Внутриклеточная регистрация активности T, P и N клеток (см. рис. 15.2). Препарат представлен кусочком кожи и иннервирующим ее ганглием. При прикосновении к рецептивному полю происходит активация клеток. (A) T клетка отвечает на легкое прикосновение, недостаточное по силе, чтобы активировать P клетку. (B) Более сильное постоянное давление вызывает продолжительный разряд P клетки и быстро адаптирующийся on/off ответ T клетки. (C и D) Для активации N клетки требуется еще более сильное давление.

Fig. 15.3. Responses to Skin Stimulation by leech sensory neurons. Intracellular records of T, P, and N sensory cells (see Figure 15.2). The preparation consists of a piece of skin and the ganglion that innervates it. Cells are activated by touching or pressing their receptive fields in the skin. (A) A T cell responds to light touching that is not strong enough to stimulate the P cell. (B) Stronger, maintained pressure evokes a prolonged discharge from the P cell and a rapidly adapting "on" and "off" response from the T cell. (C and D) Still stronger pressure is needed to activate the N cell. (After Nicholls and Baylor, 1968.)

стрыми короткими сигналами (рис. 15.3A). Их чувствительные окончания состоят из небольших утолщений, расположенных между эпителиальными клетками на поверхности кожи. T клетки быстро адаптируются к производимому давлению и прекращают активность уже через доли секунды. P клетки отвечают только на определенное давление на кожу и дают медленно затухающий ответ (рис. 15.3B). N клеткам нужны еще более сильные механические раздражители: такие, как радикальная деформация кожи, например, при пощипывании кожи тупым пинцетом (рис. 15.3D). Модальности и ответы этих нейронов у пи-

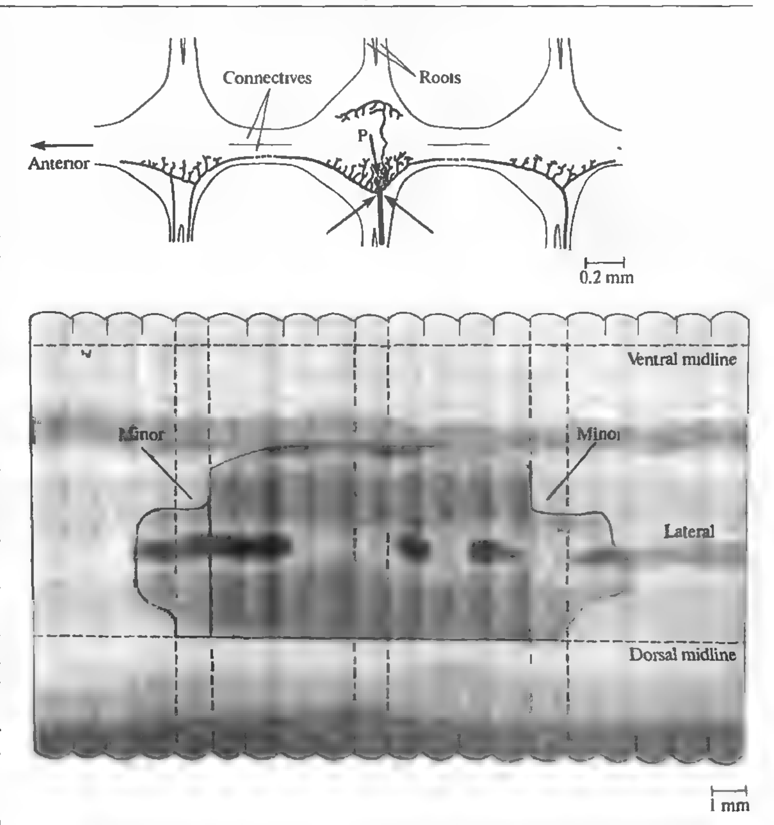


Рис. 15.4. Рецептивные поля клетки, чувствительной к давлению. P клетка посылает один аксон в составе корешков ганглия для иннервации соответственного ганглию сегмента кожи. Другие аксоны, меньшего размера, проходят через соединительные веточки к соседним ганглиям. Они проходят в составе соответствующих корешков для иннервации дополнительных (вторичных) зон соседних сегментов. Вторая P клетка (не показано) иннервирует такую же по длине территорию, но более медиально (т. е. расположенную ближе к вентральной средней линии тела). Рецептивные поля этих двух сенсорных клеток в значительной мере перекрываются. Следовательно, при давлении на кожу дорзальной области будет активироваться указанная на рисунке клетка, а при давлении на кожу вентральной области — другая. При давлении в латеральной области активизируются обе клетки. То, что аксон малого диаметра иннервирует вторичные зоны, проходя через корешки и соединительные веточки, имеет определенное значение для проведения. И хотя при этом давление в пределах вторичной зоны иннервации вызывает потенциал действия на рецепторных клетках, проведение его может быть блокировано в точках перехода малых аксонов в аксоны большего диаметра, показанных стрелками.

Fig. 15.4. Receptive Field of a Pressure Sensory Cell. This P cell has an axon that runs out through the root of its own ganglion to supply the skin of the segment in which it is situated. Other axons of smaller diameter pass along the connectives to neighboring ganglia. These axons pass through the appropriate roots to innervate additional (minor) territories in adjacent segments. The second P cell (not shown) innervates similar territory situated more medially (i. e., closer to the ventral midline) but with similar longitudinal extent. There is considerable overlap between the receptive fields of the two cells. Hence, pressure applied to dorsal skin will activate the P cell shown in this figure. Pressure applied to ventral skin will activate the other P cell. Pressure applied on lateral skin will activate both P cells. The fact that axons with a small diameter supply the minor fields by the connectives and roots has implications for conduction. Although pressure applied anywhere within the receptive field will activate action potentials, conduction can become blocked where an axon of small diameter feeds into a larger-diameter axon, as at the points marked by arrows. (After Gu, 1991.)

явки аналогичны реакции механорецепторов кожи человека (глава 18), которые способны различать прикосновение, давление и болевые раздражители. У беспозвоночных, однако, одиночная нервная клетка способна выполнять функцию многих чувствительных клеток кожи человека, иннервирующих, к примеру, кончики пальцев — очень густо иннервированную зону.

На рис. 15.4 показано, что каждая чувствительная клетка иннервирует строго определенную территорию. Эта территория может быть очерчена посредством регистрации активности клетки при раздражении кожи механическими стимулами или окрашиванием клетки и ее аксонов специальными маркерами, например, пероксидазой хрена (horseradish peroxidase)[30]. Границы иннервируемой

зоны могут быть четко идентифицированы также по различным ориентирам, таким как сегментация или окраска тела, так что можно с уверенностью сказать, какая именно клетка активируется при прикосновении, давлении или прищипывании определенной области кожи. Таким образом, одна Т клетка, чувствительная к прикосновению, иннервирует кожу дорзальной и вентральной части, а также треть боковой поверхности сегмента. Аналогично, две чувствительные Р-клетки разделяют поверхность сегмента на 2 примерно одинаковые области: вентральную и дорзальную. Пример развитой и стереотипной системы ветвления Р-клетки, полученный при использовании пероксидазы хрена (horseradish peroxidase), изображен на рис. 15.4. Т и N клетки также посылают отростки к соседним ганглиям, которые потом иннервируют вторичные зоны по обе стороны от исходного сегмента[31]. Конечные веточки отдельных чувствительных клеток иннервируют кольцевидный участок тела. Области их иннервации не перекрываются, хотя окончания разных нейронов одной модальности могут иногда вторгаться на чужую территорию. Как будет показано далее, в этом случае проведение в мельчайших веточках таких нейронов блокируется. Когда границы иннервируемых областей так хорошо различимы, также можно определить, каким образом происходит формирование зон иннервации при развитии и регенерации[32, 33].

Добавочные сенсорные клетки, специфически реагирующие на свет, химические раздражители, вибрацию и растяжение, были обнаружены в головном конце, а также в теле пиявки[34, 35].

Моторные клетки

Индивидуальные моторные клетки ганглия пиявки показаны на рис. 15.2. Критерием того, что данные клетки являются моторными, служит тот факт, что каждый импульс данной клетки вызывает потенциал действия в ее аксоне, идущем к мышце, а затем и синаптический потенциал мышечного волокна. Более 20 пар двигательных клеток, иннервирующих мускулатуру, а также управляющих работой «сердца», были обнаружены в сегментарном ганглии[28]. Благодаря им пиявка способна уплощаться, вытягиваться, сокращаться и изгибаться. Мышцы получают тормозное и модулирующее пептидэргическое влияние, а также возбуждающие импульсы через ацетилхолиновые синапсы. Нехватка всего одной клетки вызывает очевидный дефект в поведении — подобно генетическим “knockout” экспериментам на одиночных зрелых нейронах[36]. Например, в каждом ганглии имеется только по одной двигательной клетке справа и слева, которые управляют сегментарной мышцей эректора тела (annulus erector, помечена как АЕ на рис. 15.2). Импульсация этих клеток приводит к образованию на коже пиявки поперечных складок, подобных мехам баяна (рис. 15.5). Можно убить эту двигательную клетку путем введения смеси протеолитических ферментов (проназ) в сегмент интактного животного. После этого пиявка не способна выпрямлять сегмент тела, иннервируемый ранее данным двигательным нейроном, в ответ на соответствующую сенсорную стимуляцию. Однако подобный дефект непостоянен, постепенно веточки из соседних, интактных нейронов возмещают дефект иннервации[37].

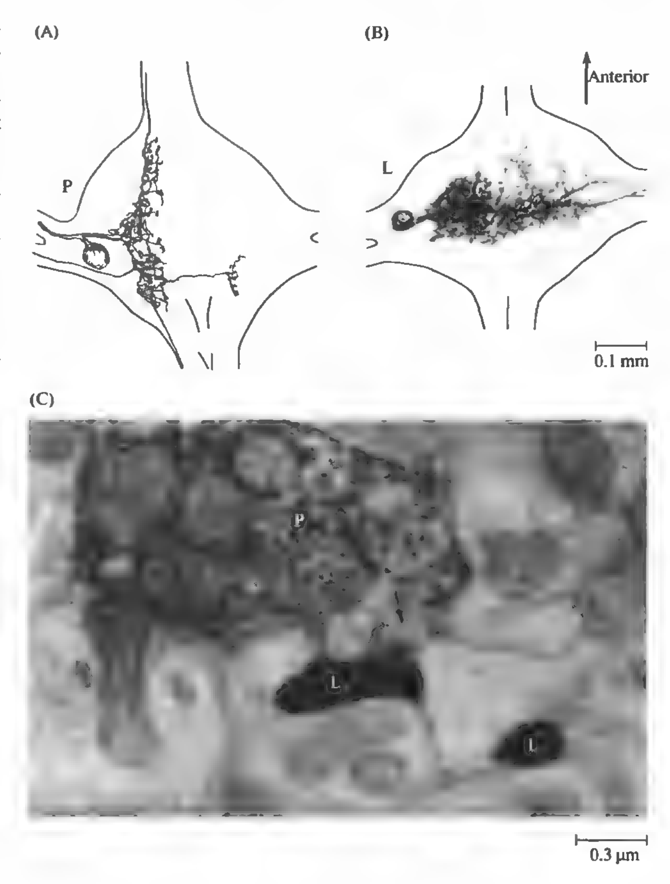
Взаимодействие чувствительных и двигательных нейронов

В нервной системе беспозвоночных синапсы между нейронами обычно располагаются не на соме, а на отростках в центральной части ганглия (область нейропиля)[26, 38–40]. Синаптические потенциалы из нейропиля распространяются на сому клетки, где они и регистрируются как тормозные или возбуждающие потенциалы. Токи, протекающие через сому клетки, способны влиять на синаптические потенциалы и высвобождение медиатора. Несмотря на сложность строения, организация нейропиля крайне упорядочена. Это было установлено в экспериментах Мюллера и МакМахана, которые первыми разработали методику внутриклеточного введения пероксидазы хрена на изолированных нейронах пиявки.

Характер ветвления чувствительных и двигательных клеток в нейропиле имеет свои особенности: каждая клетка демонстрирует свойственную только ей конфигурацию. Примеры типичного ветвления отдельных нейронов изображены на рис. 15.4 и 15.5. Единичная чувствительная клетка образует много модулирующих синапсов с другими клетками, получая в то же время регуляторные импульсы от значительного количества нервных клеток. Электрические синапсы напоминают щелевые контакты (gap junctions) с зазором поряд-

Рис. 15.5. Структуры пресинаптических и постсинаптических клеток, выявленные путем внутриклеточной инъекции пероксидазы хрена. (A) Ветвистая древовидная структура P клеток (см. рис. 15.4) с большим количеством маленьких утолщений, которые являются активными зонами пресинаптических окончаний, секретирующими медиатор. (B) L мотонейрон посылает свой аксон в составе контралатеральных корешков. Его отростки в ганглии не имеют расширений, ибо являются постсинаптическими зонами, образующими синапсы. (C) Синапс (показано стрелкой) между P клеткой и L мотонейроном в области нейропиля. Пероксидаза хрена была введена в обе клетки.

Fig. 15.5. Structures of Pre- and Postsynaptic Cells labeled by intracellular injection of horseradish peroxidase. (A) The arborization of a P cell (shown in Figure 15.4) is profuse with numerous small varicosities. They represent sites of presynaptic endings that release transmitter. (B) The L motoneuron sends its axons out through contralateral roots. Its processes within the ganglion are smooth and represent postsynaptic sites upon which synapses are made. (C) A synapse (arrow) made by a P cell on an L motoneuron in the neuropil. Both cells were injected with horseradish peroxidase. (After Muller, 1981.)



ка 4–6 нм между мембранами. Флуоресцентные красители, такие как люцифер желтый при введении их в клетку обычно, но не всегда, проходят через электрические синапсы и проникают в соседние клетки.

T, P и N клетки, отвечающие на соответствующие механические стимулы, образуют возбуждающие связи с L клетками (названными так потому, что они иннервируют продольные — longitudinal — мышцы), которые управляют сокращением пиявки. Несколькими способами, в том числе и посредством электронной микроскопии, было показано, что эти связи являются прямыми, т. е. отсутствуют какие-либо вставочные нейроны[41]. Это является очень важным фактом, так как только при условии, что известны все составляющие данной цепочки, состоящей из нервных клеток, можно точно выделить те участки, на которых происходят интересные изменения сигнала.

Механизм передачи сигнала на двигательные L клетки различен и уникален для каждой чувствительной клетки. N клетки образуют химический синапс (с еле заметным намеком на электрическое соединение), T клетки формируют выпрямляющий электрический синапс, а P клетки — комбинацию обоих способов[41]. Также P и N клетки образуют прямые химические синапсы еще на одной клетке — AE мотонейроне. Трансмиттерами служат ацетилхолин, ГАМК, глутамат, дофамин, серотонин и пептиды[42)–44)].

Кратковременные изменения синаптической передачи

Во время того, как пиявка плывет или передвигается по поверхности, механическая стимуляция кожи вызывает серии импульсов. В этих условиях повторной активности пе-

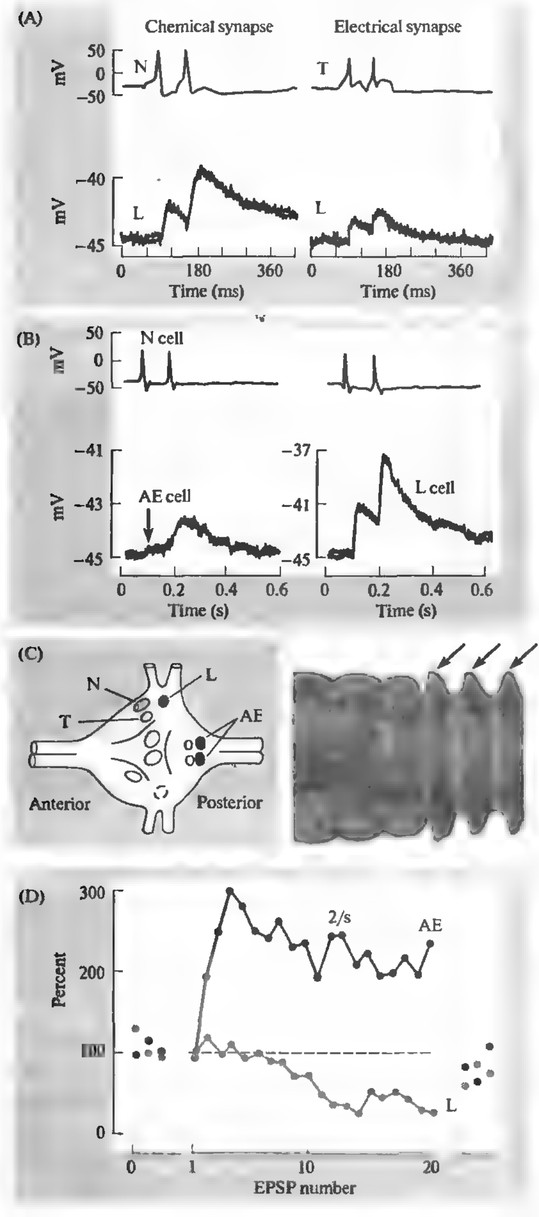


Рис. 15.6. Облегчение и депрессия в синапсах между сенсорными и двигательными нейронами пиявки. (А) Сравнение химической и электрической передачи в ганглии. N клетка стимулируется двумя последовательными импульсами (показано вверху). В химических синапсах между N и L клетками возникает облегчение, поэтому второй импульс вызывает более высокий по амплитуде и более длительный синаптический потенциал (внизу слева). Наоборот, потенциалы в синапсах между T и L клетками, вызванные как первым, так и вторым импульсом, одинаковы по амплитуде и длительности. Этот синапс является типичным примером электрического синапса. (В) Особенности освобождения медиатора в различных синапсах. При стимуляции N клетки регистрировали ответы L и AE клеток. Большее облегчение было зарегистрировано в синапсе между N и AE клетками (ответ на первый импульс в AE клетке, малой амплитуды, показан стрелкой). (С) Импульсы в AE клетке приводят к образованию складок (показано стрелками). (D) При стимуляции N клеток с частотой 2 импульса в секунду амплитуда синаптического потенциала в AE клетках за счет облегчения возрастает более чем в 2 раза, а потенциал в L клетках уменьшается. По оси абсцисс указан номер сигнала в пачке. По оси ординат отложены пропорциональные величины синаптических потенциалов, по сравнению со средним потенциалом, рассчитанным на основе одиночных стимуляций и принятым за 100 %.

Fig. 15.6. Facilitation and Depression at synapses between leech sensory and motor neurons. (A) Comparison of chemical and electrical transmission in a ganglion. An N cell is stimulated twice in succession, and at the same time its impulses are recorded (upper traces). At the chemical synapse between N and L cells, facilitation occurs, so a second impulse leads to a larger synaptic potential (bottom left). In contrast, two potentials evoked by T cell impulses in an L cell cause unchanged postsynaptic potentials with double stimulation. This is typical of electrical synapses. (B) Characteristics of transmitter release at different synapses made by a presynaptic neuron. An N cell is stimulated, and responses are recorded in L and AE cells. Facilitation is greater at the N–AE synapse. (The small first synaptic potential in the AE cell is marked by an arrow.) (C) Impulses in an AE cell produce annular erection (arrows). (D) When the N cell is stimulated at a rate of 2 per second, the synaptic potentials in the AE cell are facilitated to more than double their original size, whereas those in the L cell decrease in amplitude. The abscissa indicates the number of the synaptic potential recorded in the train. The ordinate gives the proportional height of the synaptic potentials compared with the average value before the train (100 %). (A after Nicholls and Purves, 1972; B–D after Muller and Nicholls, 1974.)

редача в химических синапсах значительным образом меняется по силе (глава 12). Различная активность разных химических синапсов способствует последовательной активации или инактивации двух различных постсинаптических мишеней одним чувствительным нейроном[45], активируя сначала одну, а потом другую. Такой тип «дифференцированно-

го» воздействия хорошо объясняет тот факт, что при давлении на кожу пиявки сначала возникает сокращение, а потом выпрямление сегментов.

Сокращение стенок тела возникает быстро и длится недолго, в то время как распрямление (erection) мышечного кольца происходит более медленно и длится дольше. Такая реакция хорошо объясняется синаптическими потенциалами, показанными на рис. 15.6, которые вызывают облегчение на определенных частотах и управляют последовательной активацией двух мотонейронов. Когда N клетка посылает серию импульсов в ответ на физиологический раздражитель, синаптические потенциалы в химических синапсах могут быть обнаружены как в L, так и в AE мотонейронах. Эти синаптические потенциалы проходят фазы облегчения и депрессии. Облегчение (facilitation), однако, значительно более выражено и дольше длится в синапсах AE мотонейронов. Большое количество косвенных экспериментов позволяют предполагать, что облегчение и депрессия зависят от количества медиатора, высвобожденного из терминалей N клеток. Сходные эффекты были обнаружены в клетках-мишенях, иннервируемых кортикальными нейронами[46)].

У пиявок и *Aplysia*[47, 48)] имеются и более медленные пути проведения сигнала, посредством интернейронов, которые идут параллельно основному пути. Они служат для координации более сложных движений в определенную сторону в ответ на механическое раздражение. Например, Кристан и его коллеги показали, что в случае давления на одну сторону пиявки возникает сгибание тела. Направление сгибания зависит от того, на какой участок тела наносится раздражение[49, 50)]. Рефлекс сгибания способствует развороту тела от раздражителя. Относительная частота активности четырех P нейронов, которые распознают место нанесения раздражения, анализируется сетью из 25–30 интернейронов, контролирующих сгибание тела в нужном направлении (рис. 15.7). Это достигается путем сокращения одних мышц и расслабления других. То, каким образом происходит активация двигательных нейронов, зависит от результатов работы этой нейронной сети. Интересно, что в стоматогастрическом ганглии омаров[51)–53)] любой интернейрон может быть вовлечен в анализ большого количества движений.

Мембранный потенциал, пресинаптическое ингибирование и освобождение медиатора

У пиявки насосную функцию кровеносных сосудов, составляющих сегментарные «сердца», контролируют мотонейроны ЦНС. Циркуляция крови зависит от перистальтических волн, распространяющихся вдоль тела животного, и скоординированного насосного механизма по обеим сторонам тела. В хорошо изученных нейронах пиявки, управляющих частотой сокращения «сердец», ритмическая активность формируется путем циклического изменения мембранного потенциала за счет синапсов вставочных нейронов[24)]. Это, в свою очередь, регулирует процесс освобождения медиатора в двигательных клетках. Деполяризация и гиперполяризация на пресинаптическом уровне уже в течение короткого времени вызывают значительные реакции[54)]. В частности, длительная деполяризация пресинаптической терминали в синапсе между интернейроном и двигательным мотонейроном «сердца» приводит к тому, что в ответ на потенциал действия выделяется больше медиатора. И наоборот, если пресинаптическая терминаль гиперполяризуется, высвобождается меньшее количество передатчика.

Сдвиг потенциала покоя даже на 5 мВ (от −40 до −35 мВ) может вызвать трехкратное увеличение количества высвобождаемого медиатора, в то время как амплитуда и продолжительность потенциала действия не так явно меняются в ответ на подобное изменение МП. Нервная терминаль периодически гиперполяризуется в результате тормозного влияния отдельных интернейронов, что значительно уменьшает количество квантов медиатора, выделяющихся в ответ на приходящий импульс. Это является примером того, как осуществляется пресинаптическое ингибирование при гиперполяризации, механизм которой можно объяснить путем анализа квантового состава. Торможение так реализовано во времени, чтобы обеспечивать расслабление сосудов тела с одной стороны во время сокращения их на контралатеральной стороне. Аналогичное влияние величины мембранного потенциала на пресинапсе на секрецию медиатора можно более тщательно изучить на синапсах, образующихся между нейронами в культуре клеток[55)].

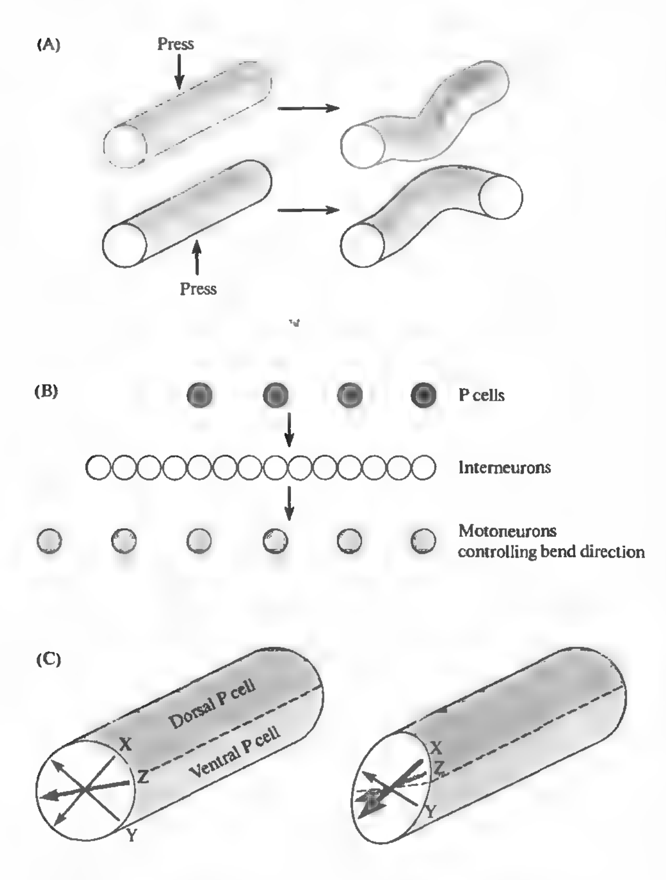


Рис. 15.7. Интеграция информации интернейронами при осуществлении рефлекса сгибания тела у пиявки. При давлении на какую-либо часть тела пиявки возникает сгибательный рефлекс, в результате которого эта часть тела перемещается в сторону от действия раздражителя. Сенсорные нейроны прикосновения (Т) и давления (Р) посылают сигналы к серии интернейронов, которые, в свою очередь, образуют возбуждающие и тормозные связи с мотонейронами. (А) При активации Р клетки, иннервирующей дорзальную область кожи, продольные мышцы непосредственно под местом прикосновения сокращаются, а на противоположном конце расслабляются за счет торможения. Аналогичным образом при давлении на вентральную поверхность тела сокращаются продольные мышцы брюшной стороны, а мышцы дорзальной стороны расслабляются. (В) Схема соединений между 4-мя Р клетками и интернейронами, которые, в свою очередь, активируют и ингибируют двигательные нейроны, участвующие в сгибании тела. (С) При активации обеих Р клеток одновременно (в случае одновременного давления в точках X и Y или при давлении в точке Z) интернейроны интегрируют информацию и рассчитывают правильный вектор сгибания. Направление сгибания может быть рассчитано на основе разностей частот импульсации обеих Р клеток.

Fig. 15.7. Integration by Interneurons used in leech bending reflex. When the surface of a leech is pressed on one part, a reflex bend occurs in the body so as to move that region away from the stimulus. Touch (T) and pressure (P) sensory neurons convey signals to an array of interneurons. These in turn make excitatory and inhibitory connections on motoneurons. (A) When the P cell innervating dorsal skin is activated by pressure (arrow), the longitudinal muscles immediately underneath the skin contract, while those on the opposite side of the body relax through inhibition. Similarly, when ventral skin is pressed, the ventral longitudinal muscle contracts, while dorsal muscle on the opposite side of the animal relaxes. (B) Scheme for connections of the four P cells that connect to the interneurons that in turn excite or inhibit motoneurons used for bending. (C) When both P cells are activated, by pressing simultaneously at X and at Y, or by pressing at Z, the interneurons integrate the information and give rise to a vector producing an appropriate bend. The direction of the bend can be accurately predicted from the firing frequencies of the two P cells. (After Lewis and Kristan, 1998.)

Повторная активность и блок проведения сигнала

Угнетение проведения сигнала представляет собой еще один хорошо изученный механизм регулирования работы синапса. В ЦНС пиявок и тараканов, а также в двигательных аксонах ракообразных[56)] в ответ на серию потенциалов действия физиологической частоты возникает угнетение проводимости сигнала на определенных участках ветвления. В Т, N и Р нейронах пиявки механизм подобного ингибирования зависит от гиперполяризации, вызываемой электрогенным натриевым насосом и длительными изменениями проводимости кальций-активируемых калиевых каналов. Так, например, частые повторные прикосновения или давление на кожу пиявки вызывают серию импульсов и длительную гиперполяризацию Р клеток. В результате это-

го проведение сигнала блокируется в точках ветвления в области нейропиля, где создаются неблагоприятные условия для проведения импульса[34]. Именно здесь аксоны малого диаметра переходят в большие по диаметру (глава 7), в то время как в других веточках этого же нейрона сигнал проводится[57].

Блок проведения является несинаптическим механизмом, который на время отсоединяет T или P клетки от некоторых их мишеней. Когда же блокированными оказываются не все, а только часть волокон, освобождение передатчика происходит, но в меньшем количестве. Повреждая при помощи лазера определенные точки ветвления, Мюллер с коллегами сумели оценить вклад отдельных веточек P клеток[58]. Пример блока проведения в P клетках показан на рис. 15.8. Синаптические потенциалы, записанные на пресинапсах AE мотонейронов, полностью исчезли при блоке проведения в ответ на повреждения лазером, нанесенные в точках «X» (рис. 15.8B). Однако одновременно с этим синаптические потенциалы были зарегистрированы в L мотонейроне, иннервируемом той же P клеткой, поскольку этот мотонейрон получал сигналы от веточек, проведение в которых не было нарушено. Повторная активность в физиологическом диапазоне частот привела (в этом случае) к достоверному уменьшению поверхности кожи, с которой вызывались ответы AE мотонейрона, т. е. к временному сокращению размеров рецепторного поля[57].

Блокирование проведения может привести порой к неожиданному эффекту. Потенциал действия, который не смог перейти с малого аксона на большой, вызывает на последнем локальный потенциал. Этот деполяризационный потенциал, имеющий подпороговую амплитуду, длится гораздо дольше, чем исходный потенциал действия. Таким образом, может возникнуть второй потенциал действия, распространяющийся ретроградно от точки ветвления в сторону терминали чувствительной клетки и там вызывающий повторное выделение медиатора, с небольшой задержкой после первого импульса[59].

Блок проведения в дорзальных аксонах спинного мозга млекопитающих впервые был описан Барроном и Метьюсом в 1935 году[60], затем прочно забыт и только гораздо позже стал изучаться на беспозвоночных. Сейчас уже очевидно, что блок проведения является ключевым моментом интегративных процессов на дендритах ЦНС млекопитающих[61].

Высшие уровни интеграции

Одной из целей изучения таких животных, как пиявки, является исследование того, каким образом простейшие элементарные рефлексы образуют сложные поведенческие реакции. Пиявка оказалась особенно подходящим объектом для изучения путей и отдельных клеток, которые действуют слаженно во время плавания. Этот сложный тип движений изучался Стентом, Кристаном, Фризером и их коллегами. Активность головного и хвостового «мозга» вовсе не являются необходимым условием для осуществления плавательного движения, которое возникает и в нескольких изолированных сегментах и даже всего в одном сегменте. Как и у других беспозвоночных (таких как тараканы, саранча и сверчки), у которых высшие моторные программы с участием небольшого количества нейронов способны контролировать сложные движения, базовый ритм движений пиявки задается рядом возбуждающих и тормозных взаимодействий в ЦНС. Периферические рецепторы служат для регуляции, усиления, ослабления или полной остановки движений пиявки. Сходным же образом препараты изолированного мозга млекопитающих способны генерировать ритм дыхательных движений *in vitro* (глава 22).

У позвоночных, в свою очередь, интересную роль в регуляции двигательной активности играют биогенные амины[62, 63]. В крови неподвижных, вялых и не плавающих пиявок уровень серотонина ниже, чем у активных пиявок. Более того, стимуляция секретирующих серотонин клеток (известных как клетки Ретциуса (Retzius cells)), приводит к увеличению его концентрации в крови, и в конечном счете способствует повышению активности всего животного. Можно полностью удалить серотонин из крови эмбриона при помощи специального реактива (5,6-дигидрокситриптамин), который избирательно разрушает серотонинэргические нейроны в развивающихся ганглиях. Такое взрослое животное само по себе не способно плавать, однако плавательные движения появляются при добавлении в среду серотонина.

Сенситизация и S интернейроны

Механизм того, как отдельный нейрон может играть координирующую роль в поведении животного, тщательным образом изучал-

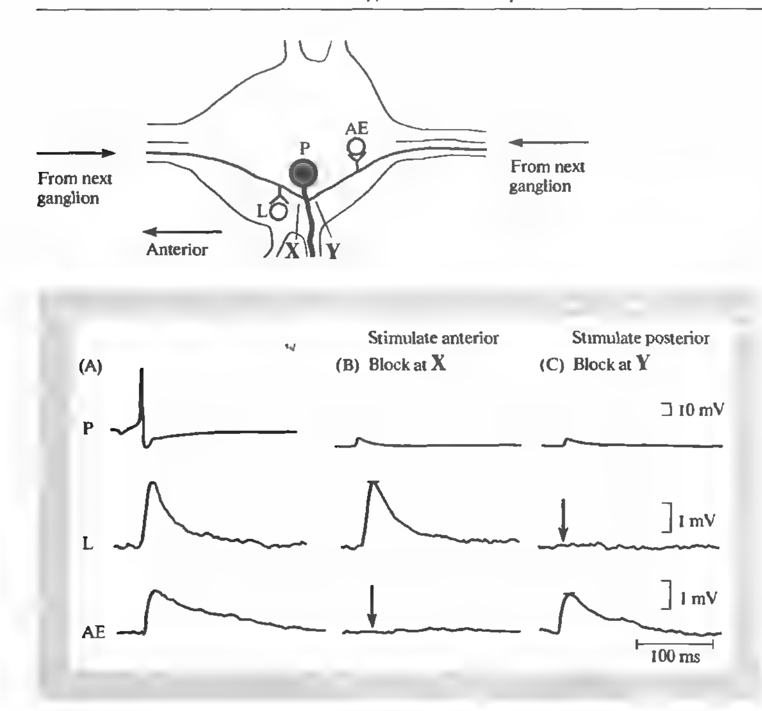


Рис. 15.8. Роль блока проведения сигнала в процессах синаптической передачи и интеграции. Медиально расположенная Р клетка (иннервирующая дорзальный участок тела, как показано на рис. 15.4) посылает пресинаптические аксоны к моторным клеткам, вызывающим сокращение продольных мышц тела (L клетки) и образование складок (АЕ клетки). (А) Синаптические потенциалы в L и АЕ клетках, вызванные при стимуляции Р нейронов внутриклеточно введенным электродом. Импульсы, возникшие в соседних сегментах тела в ответ на давление, распространяются по малым аксонам в составе соединительных веточек (коннектив), вовлекают все ветви Р нейрона и вызывают синаптические потенциалы как на АЕ, так и на L клетках. (В) При многократном раздражении кожи в области самого переднего сегмента тела, Р клетка гиперполяризуется, и проведение сигналов блокируется в точке X. При этом L клетка по-прежнему продолжает получать импульсы, которые вызывают на ее дендритах синаптический потенциал, однако АЕ клетка оказывается на время изолированной (показано стрелкой). (С) Наоборот, при стимуляции самого заднего сегмента сначала импульсы распространяются на все веточки Р клетки, так же как и в случае А. Однако после многократной стимуляции возникает блок в точке Y, где аксон малого диаметра переходит в большой аксон. И вновь это приводит к изоляции клетки (показано стрелкой). Однако сейчас изолированной оказывается L клетка, а АЕ клетка остается активной.

Fig. 15.8. Effects of Conduction Block on synaptic transmission and integration. The medially situated P cell (innervating dorsal skin and similar to that shown in Figure 15.14) sends presynaptic axons to motor cells that cause the longitudinal muscles to contract (L cell) and the annuli to erect (AE cell). (A) The synaptic potentials in the L cell and the AE cell were evoked by stimulating the P cell intracellularly. When the impulses originate in the neighboring segment by pressure, they travel along the small axons in the connective, successfully invade all the branches of the P cell, and produce synaptic potentials in the AE and the L cell. (B) When the skin in the next most anterior segment is pressed repeatedly, the P cell becomes hyperpolarized and impulse conduction fails at the point labeled X. When this occurs, the L cell still receives its input and produces a synaptic potential, but the AE cell has been temporarily disconnected (arrow). (C) Conversely, when the posterior field is stimulated, impulses initially invade all the branches in the P cell, as in A. After repetitive stimulation, however, they become blocked at Y, where the small axon encounters the larger axon. Once again cells become disconnected (arrow). This time, however, it is the L cell that fails to show a synaptic potential, while the AE cell continues to do so. (After Gu, 1991.)

ся на насекомых и ракообразных, у которых были описаны отдельные «командные» нейроны, способные дирижировать оркестром поведенческих реакций всего организма. У пиявки эту роль играет непарный интернейрон, присутствующий в каждом ганглии и называемый S клеткой (рис. 15.2 и 15.9)[64]. Этот нейрон получает возбуждающие импульсы от чувствительных клеток при касании и давлении и в свою очередь возбуждает L мотонейрон, который способствует сокращению тела (как ранее было указано). Каждая S клетка связана с S клеткой соседних сегментов посредством толстого аксона с большой скоростью проведения через электрический синапс. То, что синапс находится посередине между сегментами (см. рис. 15.9), можно определить путем введения в S клетку пероксидазы хрена, которая не может распространяться через щелевые контакты.

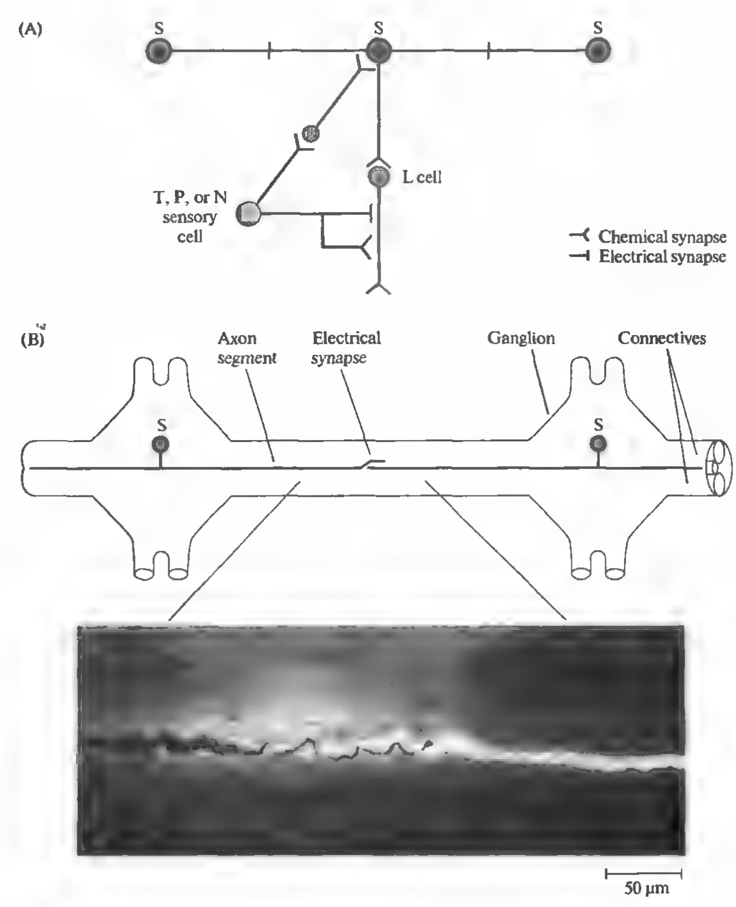
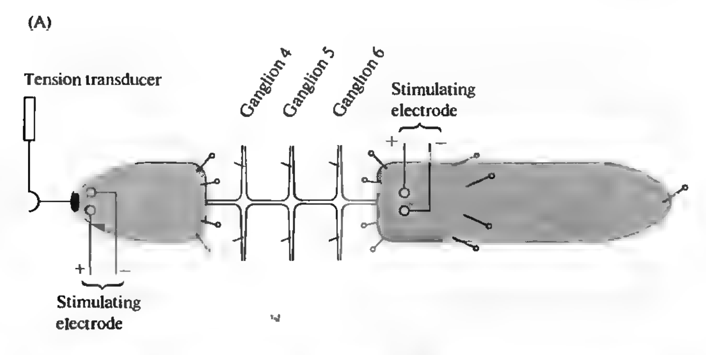


Рис. 15.9. Электрические синапсы с высокой скоростью проведения образуются между S клетками посередине соединительных ветвей (коннектив) между сегментами. (А) Электрические и химические соединения между сенсорными N, T или P клетками с S клеткой и L мотонейроном. В каждом ганглии находится только одна S клетка, аксон которой образует электрические синапсы с S клетками соседних сегментов. Распространяясь вдоль цепочки S клеток по всему телу животного, сигналы чувствительных клеток способны привести к быстрому сокращению всего тела. (В) S клетки ганглия связаны с S клетками других ганглиев посредством электрических синапсов. На микрофотографии представлена S клетка, заполненная смесью люцифера желтого (Lucifer yellow) (ЛЖ) и пероксидазы хрена (horseradish peroxidase) (ПХ). ПХ неспособна проникать через электрические синапсы, в отличие от ЛЖ. Поэтому соседняя клетка окрашивается только ЛЖ, но не ПХ. Аксон S клетки способен регенерировать, восстанавливая свои прежние соединения с высокой точностью. На микрофотографии показан аксон, полностью идентичный аксону S клетки нормального животного, однако фотография была сделана после того, как данная S клетка была повреждена и регенерировала, восстановив свои прежние соединения.

Fig. 15.9. Connections of S Cells that conduct rapidly and make electrical synapses in the midregion of the connective. (A) Electrical and chemical connections of sensory T, P, or N cells, and S cells onto the L motoneuron. Each ganglion contains only one S cell, the axons of which make electrical synapses on its homologues. Through the S cell chain along the animal, sensory stimuli cause rapid shortening. (B) S cells are connected to their homologues in neighboring ganglia by electrical synapses. The photomicrograph shows an S cell that was filled with a mixture of Lucifer yellow and horseradish peroxidase (HRP). HRP cannot cross electrical junctions, whereas Lucifer yellow can. Accordingly, the neighboring S cell axon became labeled with Lucifer yellow but not with HRP. S cell axons regenerate and re-form their connections with very high specificity after injury. The micrograph, which resembles that of a normal animal, was in fact taken from a preparation in which the axon of one S cell had been severed and had re-formed its connections after regeneration. (After Mason and Muller, 1996; micrograph kindly provided by K. Muller.)

Последовательная цепь S клеток является ключевым механизмом адаптивных реакций пиявки. При повторной тактильной стимуляции прикосновением к определенному сегменту тела сначала возникает рефлекс сокращения. Ответ становится все слабее и слабее при каждом следующем прикосновении — данный эффект известен как ***«привыкание»*** (habituation, рис. 15.9)[65]. Однако после более сильного раздражения, когда активируются P (давление) и N (боль) клетки, ответ на дальнейшую стимуляцию только T клеток (при касании) вновь становится заметным. Этот процесс известен как ***«отвыкание»*** (disha-



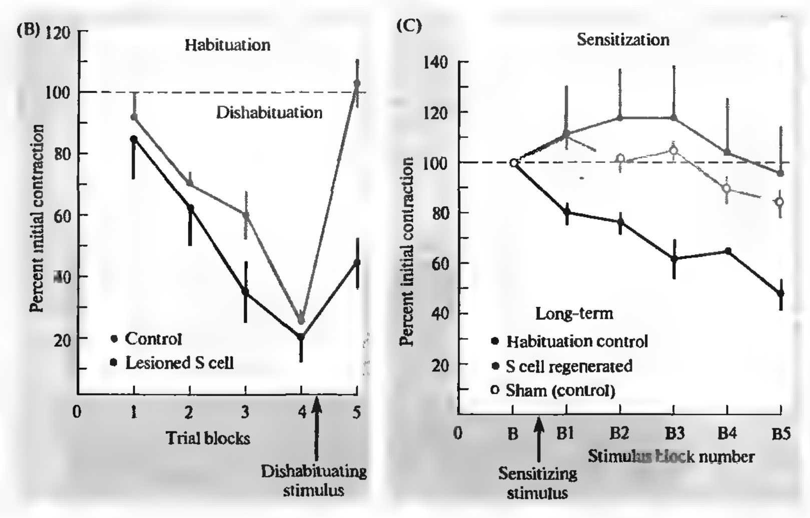


Рис. 15.10. Процессы «привыкания» (habituation), «отвыкания» (dishabituation) и сенситизации рефлексов у пиявки. Роль S клеток. (А) Изолированный ганглий соединен с передней и задней частью тела. Стимулы наносились на переднюю или заднюю часть кожи при помощи микроэлектродов или механически, для активации T, P или N сенсорных нейронов. Активность S клеток, сенсорных клеток и мотонейронов регистрировалась внутриклеточными электродами, сила сокращения мышц определялась при помощи датчика давления. При многократной слабой стимуляции хвостового конца животного возникало «привыкание». Более сильные импульсы приводили к сенситизации и «отвыканию». (В) Ответы на слабые удары током кожи задней области. В сериях стимуляций ответы становились все меньше и меньше («привыкание», показано серой линией с серыми кружками). После четырех серий с целью вызвать «отвыкание» подавался высокоамплитудный импульс, ответ на который был значительно больше по амплитуде. Когда S клетка выключалась (инъекцией проназ), наблюдалось только привыкание (показано черной линией с черными кружками). (С) После сильного сенситизирующего импульса (сенситизация, показано серой линией с серыми кружками) ответы становились выше, чем обычно при «привыкании». При выключении S клетки либо путем летальной инъекции проназ, либо при помощи перерезания ее аксона, сенситизация более не выявлялась (черная линия) и многократные импульсы вызывали только «привыкание». После того, как поврежденная S клетка регенерировала (подобно тому, как показано на рис. 15.9), стимул высокой амплитуды вновь вызывал хорошо заметную сенситизацию (серая линия с полыми кружками) и «отвыкание» (не показано на графике). Эти эксперименты показали, что отдельная S клетка является ключевым звеном в формировании сложных реакций нервного ганглия.

Fig. 15.10. Habituation, Dishabituation, and Sensitization of leech reflexes, and the role of the S cell. (A) Isolated ganglia connected to the anterior and posterior parts of the body. Stimuli are applied to anterior or posterior skin by electrodes or by mechanical stimuli that activate T, P, or N cells. Intracellular recordings are made from S cells, sensory cells, and motoneurons, and muscle contractions are measured with a tension transducer. Weak repetitive stimuli applied to the tail end of the animal give rise to habituation. A stronger stimulus gives rise to sensitization and to dishabituation. (B) Responses to weak electrical shocks to posterior skin. In repeated trials, the responses became smaller (habituation, grey circles). After the fourth trial, a dishabituating strong stimulus was given that produced a bigger response. After elimination of the S cell by killing it in one segment, only habituation occurred (black circles). (C) When a strong sensitizing stimulus was given (sensitization, grey circles), the responses became stronger than normal instead of habituating. After elimination of the S cell by killing it in one segment or by cutting its axon acutely, sensitization could no longer be elicited (black circles). Repeated stimuli gave rise only to habituation. After an S cell axon had been severed and then regenerated in the manner shown in Figure 15.9, a strong stimulus once again gave rise to clear sensitization (grey line with white circles) and dishabituation (not shown). This experiment demonstrates that a single cell is essential for these complex responses. (After Sahley et al., 1994, and Modney, Sahley, and Muller, 1997.)

bituation). Сходным же образом, если более сильный раздражитель наносится до процедуры *«обучения»*, это вызывает сенситизацию, т. е. ответ на стимуляцию при касании будет больше обычного. Активность S клеток во время *«привыкания»* не меняется, однако возрастает как при сенситизации, так и при *«отвыкании»* (см. рис. 15.10). В технически сложно выполнимых экспериментах, когда избирательно перерезается аксон S клетки, либо клетки убиваются инъекцией проназ, процессы *«привыкания»* и сокращения не изменяются, однако полностью исчезает *«отвыкание»* и сенситизация.

Во второй серии экспериментов аксоны S клеток были повреждены, чтобы исследовать их регенерацию. Удивительным свойством S клеток является то, что после повреждения их аксоны следуют по старому пути и заново образуют электрические соединения с соседним S нейроном с поразительной точностью[66]. Как и ожидалось, перерыв передачи импульсов по S клеткам между отдельными сегментами приводил к исчезновению сенситизации, однако через несколько недель после полной регенерации аксонов и восстановления прежних связей данное свойство также восстанавливалось[67].

Эти примеры наглядно демонстрируют, каким образом отдельная нервная клетка способна принимать участие в таком сложном поведенческом процессе, как сенситизация. Было установлено, что на самом деле процессы сенситизации во многом обусловлены серотонином[68]. (Необычная серия совпадений способствовала тому, что название «S клетка» стало очень подходящим для данных клеток. Изначально она была так названа, потому что ее импульс образует долгий импульс (spike) в месте контакта. Затем, обнаружив, что эти клетки очень тесно связаны друг с другом, полагали, что они могут быть синцитием. Сейчас же они называются S клетками от слов «сенситизация» и «серотонин»!) У *Aplysia* процесс сенситизации (в котором серотонин тоже играет важную роль) был очень тщательно изучен как на клеточном, так и на молекулярном уровне[69].

§ 3. Навигация у пчел и муравьев

Одним из основных методов исследования функционирования НС является количественный анализ поведения. При анализе поведения можно выявить фундаментальные принципы. Например, ключевые механизмы работы зрительной системы, которые смогли объяснить цветовое зрение и темновую адаптацию у человека, были впервые установлены при помощи психофизических экспериментов. При помощи изучения реакции разных людей на световые сигналы различной интенсивности и длины волны стало возможным сделать вывод о механизмах светового восприятия. Только значительно позже клеточные механизмы были показаны на фоторецепторах и зрительных путях (главы 19 и 20). Аналогичным образом, наблюдение за беспозвоночными в естественных условиях привело к ценным открытиям роли рецепторов и описанию интегративных функций ЦНС.

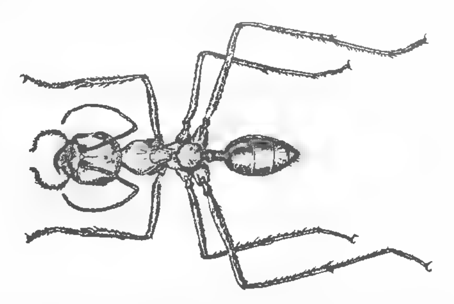


Рис. 15.11. Пустынный муравей (*Cataglyphis bicolor*), способный ориентироваться по ультрафиолетовому излучению и возвращаться к гнезду кратчайшим путем во время поиска пищи.

Fig. 15.11. The Desert Ant, Cataglyphis bicolor, which navigates successfully by means of detection of ultraviolet light. It is able to return home in a direct path after having searched for food. (After Wehner, 1994b.)

Удивительные характеристики НС беспозвоночных вызывают восхищение, например, при изучении процессов навигации у пчел и муравьев[70, 71]. Пустынный муравей может мигрировать, а пчела улетать на далекие расстояния от гнезда в поисках пищи, и затем чудесным образом они безошибочно находят дорогу обратно. Необходим целый набор различных сенсорных «подсказок» для того, чтобы подобная навигация стала возможной. Из-за того, что нервные клетки насекомых имеют маленькие размеры, зачастую довольно сложно непосредственно анализировать свойства их мембран и синаптическую передачу. Тем не менее, как будет показано в следующих разделах, можно проанализировать и сделать определенные выводы о сенсорных механизмах насекомых даже на клеточном уровне при



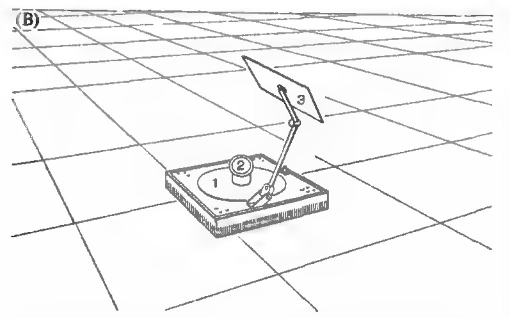


Рис. 15.12. Для изучения перемещения муравья на поверхности пустыни была нанесена сетка. (А) Полевые эксперименты по прослеживанию пути пустынного муравья, выполняемые при помощи специальной оптической системы на роликах, способной следовать за муравьем во время его движения и регистрировать траекторию его перемещений, а также контролировать и манипулировать углом обзора и оптическими свойствами воспринимаемых муравьем солнечных лучей. (В) Камера перемещалась экспериментатором таким образом, чтобы муравей всегда находился в оптическом центре системы. В горизонтальную апертуру (1) устанавливались различные фильтры, отсекающие излучение за пределами ультрафиолетового спектра или пропускающие лучи только определенной поляризации. Малая апертура (2), расположенная на цилиндре, а также экран (3) использовались для предупреждения падения прямого солнечного света на фоторецепторы муравья. Из-за высокой боковой рамы камеры муравей не мог видеть линию горизонта или какие-либо метки на поверхности пустыни. Это также ограждало его от ветра. Линии белого цвета, нанесенные на расстоянии 1 м друг от друга на поверхности пустыни, позволяли экспериментатору тщательно следить за перемещениями муравья.

Fig. 15.12. To Measure the Movements of an Ant it is placed on a grid marked out on the desert floor (A). A desert ant is tracked in the field by manipulating its skylight vision experimentally and simultaneously recording its walking trajectory using a rolling optical laboratory for following ants as they migrate along the desert floor and for controlling the portion of sky that they can observe (B). The trolley is moved by the experimenter in such a way as to keep the ant always centered within the optical setup. The horizontal aperture (1) can be fitted with filters that cut out all light apart from ultraviolet or that allow polarization in one direction. A small aperture (2) sits atop a circular tube, and the screen (3) can be used to prevent the ant from seeing sunlight directly. Since the trolley has a frame, the little ant cannot see the skyline or markers on the ground. It is also shielded from the wind. The white lines are 1 m apart and are painted on the desert floor to enable the observers to track the ant's progress accurately. (After Wehner, 1994b; photograph kindly provided by R. Wehner.)

помощи особым образом спланированных поведенческих экспериментов.

Как пустынный муравей находит дорогу домой

Венер с коллегами экспериментально изучал, каким образом пустынный муравей *Cataglyphis bicolor* (рис. 15.11) способен мигрировать на далекие дистанции в поисках пищи и затем возвращаться к гнезду по прямому кратчайшему пути. Принцип их экспериментов показан на рис. 15.12 и 15.13[72, 73)]. Область вокруг гнезда (в пустыне Туниса), а также места расположения пищи отмечены квадратиками. За отдельным муравьем наблюдали во время того, как он искал источник пищи и возвращался с ней в гнездо. На рис. 15.13 длинный и извилистый путь от гнезда (от пункта А до пункта В) занимает около 19 минут (точка на маршруте равна 1 минуте). Дорога домой, наоборот, идет строго по прямой, не петляет и занимает около 6 минут. Каким-то образом муравей учел свои движения на протяжении 250 метров от гнезда. Каким-то образом он также отследил углы поворотов и пройденные дистанции. Муравей способен отойти от гнезда на расстояние более 100 метров и вернуться к нему обратно с точность до 1 метра, т. е. с ошибкой менее 1 % (в этом отношении муравей способен сделать это гораздо лучше, чем по крайней мере

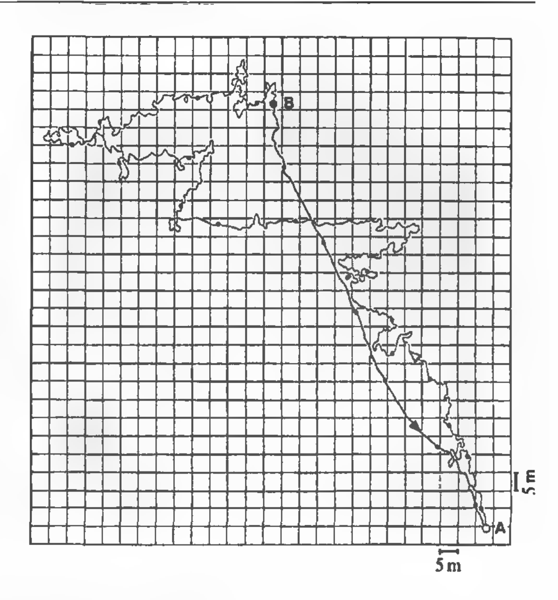


Рис. 15.13. Путь, пройденный муравьем от гнезда (А) до источника пищи (В). Каждая точка на пути туда и обратно отмечает промежуток времени в 1 минуту. В поисках пищи муравей проходит извилистый путь длиной 592 метра, однако обратно он следует по кратчайшему пути (140 м), без отклонений и удивительно точно.

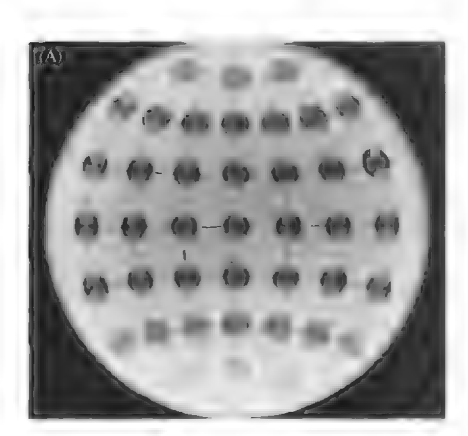
Fig. 15.13. Pathway Taken by an Ant from its nest (A) to the source of food (B). Each dot on the trace toward food and back represents 1 minute of time. The ant progresses to the food in a tortuous path over 592 m. But it heads straight for home (140 m) with no deviation and amazing accuracy. (After Wehner, 1994a.)

один из авторов этой книги, который не имеет математических навыков в подобного рода расчетах).

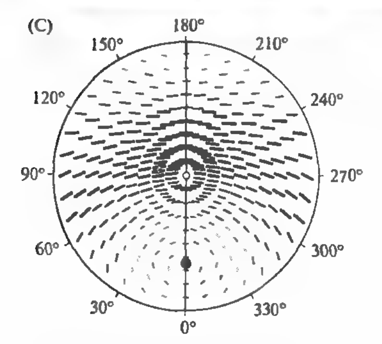
Какие же ориентиры окружающей среды муравей использует для навигации? Первая мысль — может быть, это феромоны или химические сигналы. Однако они не используются и в любом случае были бы бесполезны при очень высокой (до 45° С) температуре в пустыне[74]. Пространственные ориентиры и характерные элементы ландшафта в пустыне немногочисленны. Хотя предметы по дороге и около гнезда и в самом деле могут давать определенную информацию (как мы очень скоро увидим), они вовсе не являются теми удивительными «компасами», которые используют муравьи. Это было установлено при помощи экспериментов, когда муравьи были способны найти обратный путь, видя всего лишь небольшую часть неба[71]. Чтобы исключить солнце и все другие ориентиры, экспериментатор следовал за муравьем с небольшой камерой (см. рис. 15.12), держа ее отверстие (через которое было видно небо) точно над муравьем. В отверстие помещались специальные фильтры для выбора направления, длины волны и угла поляризации солнечного света, воспринимаемого муравьем. Даже без солнца, отличительных деталей ландшафта и запахов, муравей, видя только небо, направлялся прямо к гнезду, в то время как экспериментатор катил камеру за ним, скрытый в маленьком вагончике.

Использование поляризованного света как компаса

О поляризации электромагнитного излучения говорят, когда вектор электрической напряженности электромагнитной волны колеблется в одной плоскости. Известно, что солнечный свет становится поляризованным при прохождении атмосферы: через ориентированный определенным образом поляризующий фильтр небо выглядит темным (так как отсекается поляризованный свет). Свет, отраженный от неровной поверхности облаков, однако, уже не является поляризованным. Следовательно, через подобный фильтр облака будут выглядеть более яркими. Когда солнце находится точно в зените, картина поляризации довольно проста. Все направления поляризации в горизонтальной плоскости будут представлены пропорционально, следовательно, это не может служить компасом. Однако, если лучи солнца падают не под прямым углом, возникает асимметричное множество направлений поляризации, как показано на рис. 15.14. Эта картина поляризации может, в принципе, служить картой для навигации. И хотя глаз человека не способен воспринимать поляризованный свет, глаз пустынного муравья на это способен, как, впрочем, и глаза пчел, ос и ракообразных[75]. Картина поляризации света показывает (определяет) положение солнца вне зависимости от того, можно ли его увидеть напрямую или нет.







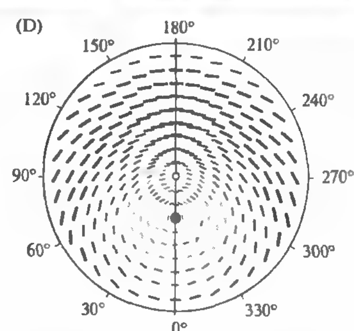


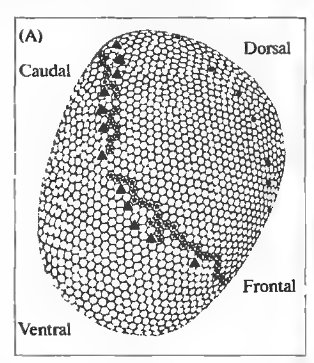
Рис. 15.14. Структура поляризованного солнечного света и регистрация его при помощи набора разных поляризующих фильтров. (А, В) Набор поляризующих фильтров, установленных в виде купола с целью регистрации картины поляризованного солнечного света. Для человека, стоящего на широте экватора в полдень, когда солнце находится строго в зените, картина выглядит полностью симметричной. (С, D) При перемещении солнца из одного положения в другое меняется и поляризационная картина, что указано черными точками. Муравью достаточно видеть небольшой кусочек неба, чтобы рассчитать положение солнца и правильно сориентироваться.

Fig. 15.14. Patterns of Polarized Light and Their Detection by an array of polarizing filters. (A, B) The arrangement of polarizing filters mounted in a dome so as to detect patterns of polarized light in the sky. For a person standing at the equator at noon with the sun shining directly overhead, the patterns would be completely symmetrical. (C, D) The patterns produced by light from the sun at two different positions, indicated by the black dots. The ant need only observe a small part of the heavens in order to compute the position of the sun and thereby navigate successfully. (A and B after Wehner, 1994a; C and D after Wehner, 1997.)

Восприятие поляризованного света глазом муравья

Мультифасеточный сложный глаз муравья состоит из набора отдельных единиц, омматидий (ommatidia), от каждой из которых идет свое нервное волокно. В каждой омматидии находится 8 фоторецепторов. Каждая омматидия видит мир в собственной перспективе[76]. У пустынного муравья определенные группы омматидий чувствительны к поляризованному свету строго определенной ориентации. Они расположены в области дорзального ободка (dorsal rim) сложного глаза и воспринимают свет преимущественно в УФ диапазоне. На рис. 15.15 и 15.16 показано расположение этих рецепторов. Их чувствительность к поляризации возникает из-за точной ориентации мембран, содержащих фотопигмент родопсин. Молекулы родопсина расположены параллельно, в однотипно расположенных микроворсинках фоторецепторных клеток, как показано на рис. 15.16[77]. Так как родопсин оптимально поглощает свет, направленный вдоль длинной оси молекулы, только одна определенная плоскость поляризованно-

Рис. 15.15. Детекторы поляризованного света в глазу пустынного муравья. (А) Пространственная организация фоторецепторов. Рецепторы, воспринимающие поляризованный свет, расположены дорзальнее помеченной линии. Именно эту часть глаза муравей использует для ориентирования и навигации. (В) Снимок глаза муравья, сделанный сканирующим электронным микроскопом. Контактная линза, установленная в дорзальной области глаза, стушевывает границы между фоторецепторами.



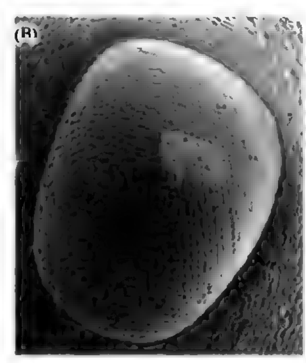


Fig. 15.15. Polarized Light Detectors in the Eye of the Desert Ant. (A) The arrangement of photo-receptors. The receptors for polarized light lie in the region dorsal to the line marked by triangles. This is the region of the eye that the ant uses to navigate. (B) Scanning electron micrograph of the eye of the ant. A contact lens was placed over part of this eye, blurring the outlines of the photoreceptors. (After Wehner, 1994a.)

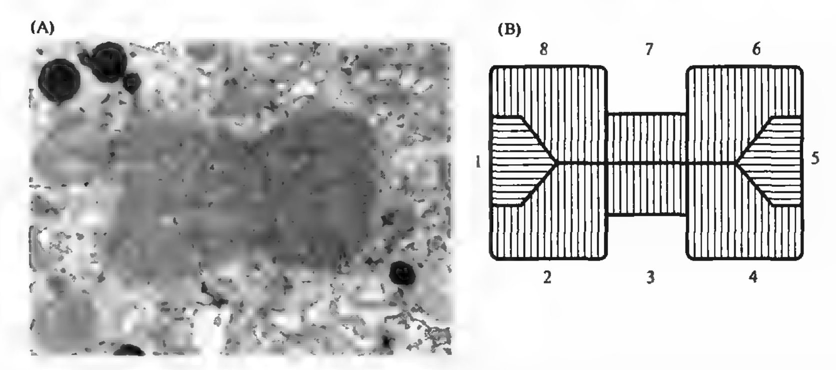


Рис. 15.16. Пространственная организация фоторецепторов, воспринимающих поляризованный свет. (А) Электронная микрофотограмма дорзальной области глаза муравья. Микроворсинки омматидии расположены под прямыми углами друг к другу с удивительной точностью. (В) Диаграмма организации микроворсинок. 1-я и 5-я зоны воспринимают преимущественно поляризованный свет, падающий под определенным углом поляризации относительно других зон. В других же областях глаза микроворсинки могут располагаться и под другими углами относительно друг друга.

Fig. 15.16. Arrangement of Photoreceptors Responsive to Polarized Light. (A) Electron micrograph of the dorsal region of the eye of an ant. The microvilli in the ommatidia are orthogonally arranged in a remarkably precise manner. (B) Diagram of the arrangement of microvilli. The numbers 1 and 5 respond preferentially to polarized light at a direction at right angles to those preferred by the other receptors. Elsewhere in the eye the microvilli are not necessarily at right angles in this way. (Electron micrograph kindly provided by Rudiiger Wehner; B after Wehner, 1996.)

го света будет наиболее эффективно вызывать электрические сигналы в данной фоторецепторной клетке. Более того, молекулы родопсина в четырех различных фоторецепторах одной омматидии дорзального ободка ориентированы таким образом, что образуют углы строго 90° по отношению друг к другу. Такая ориентация фоторецепторов присутствует только в тех зонах, которые ответственны за восприятие поляризованного света. Ортогональная ориентация четырех фоторецепторов в одной омматидии кажется специально созданной для определения угла поляризации. (Одиночный фоторецептор сам по себе не способен различить разницу в интенсивности, длине волны и угле поляризации). Очень сходные по строению образования найдены и в глазах ракообразных.

Доказательством того, что поляризованный свет является основным условием для ориентации у муравьев, служат следующие эксперименты. Во-первых, если глаз покрыть

контактными линзами, пропускающими свет только в области переднего дорзального квадранта, муравей все равно способен находить прямую дорогу домой. Во-вторых, если область дорзального ободка закрыта, поиск обратного пути нарушается. В-третьих, если угол поляризованного света, падающего на глаз муравья, дополнительно сдвигается при помощи подходящих фильтров, на обратном пути муравей отклоняется от правильного направления на строго определенную и поддающуюся расчету величину.

Для успешной навигации информация, получаемая муравьем посредством зрения, должна коррелировать с картой звездного неба, положение солнца на которой определяет направление поляризации света. По мере того как муравей удаляется от гнезда, омматидии обеспечивают его ориентирами относительно довольно запутанного, но тем не менее постоянного неба. На основании этого НС рассчитывает пройденное расстояние и углы поворота. Сложный глаз муравья имеет полусферическую форму, что обеспечивает достоверное пространственное восприятие ориентации поляризованного света, как показано на рис. 15.14. Более того, при анализе распределения омматидий, воспринимающих поляризованный свет определенной ориентации, можно выявить, что расположение этих омматидий и их нервных элементов формирует как бы нейронную «карту», коррелирующую с распределением поляризованного света неба. В результате этого степень соответствия между данной «картой» и поляризацией солнечного света может быть использована для определения направления движения, которое может быть рассчитано как муравьем, так и исследователем.

Стратегии по поиску дороги к гнезду

Проблема заключается в том, что солнце не находится постоянно на одном месте. Следовательно, муравей должен компенсировать перемещение солнца в течение дня. Это было подтверждено в экспериментах, в которых муравей на 1 час помещался в темную камеру вдали от гнезда, а затем выпускался. Муравей, наблюдавший за перемещением солнца по небу в течение хотя бы одного дня, был способен корректировать свою траекторию, как будто он запомнил или знал, каким образом распределяется поляризованный солнечный свет в разное время суток. Кроме поляризованного света, само положение солнца, а также внешние объекты, расположенные вдоль пути, могут помочь в навигации[78]. Характерные детали ландшафта и различные предметы очень важны на последнем этапе при возвращении в гнездо, вход в которое является всего лишь маленьким отверстием в пустыне. Если вектор по направлению к дому был рассчитан с ошибкой, и муравей не вышел точно к гнезду, он начинает использовать новую стратегию[79]. Муравей осуществляет серию петлеобразных перемещений, постепенно увеличивающихся в диаметре, но всегда возвращающихся в исходную точку, с целью исследовать окружающее пространство. Это является оптимальной стратегией для точной рекогносцировки без опасности заблудиться.

Нервные механизмы навигации

Одним из важных результатов подобных исследований является получение детальной информации об исходных сенсорных механизмах ориентирования. Поскольку каждая омматидия дорзального ободка содержит два набора фоторецепторов, способных воспринимать плоскость поляризации света, расположенных под определенным углом друг к другу, и поскольку каждая омматидия воспринимает небо под несколько различным углом, набор из множества омматидий обеспечивает мозг информацией о пространственном распределении векторов поляризованного света. Более того, можно рассчитать, каким образом будет реагировать эта система на разного рода нетипичные помехи. При изучении поведения использовались различные объекты, которые помещались на пути движения насекомого, вынуждая его отклоняться от первоначального пути и затем корректировать это отклонение. Другого рода помехой может быть перемещение муравьев в разное время суток, а также разного рода изменения поляризованного света, воспринимаемого ими. Одновременно с этим, точные электрофизиологические эксперименты для выявления интегративных механизмов в нейронах мозга муравья пока не могут быть выполнены по техническим причинам. Поэтому связь между входной сенсорной информацией и моторными командами у муравья остается пока неясной. Тем не менее, используя вычислительный подход на основе известных свойств нейронов, могут быть созданы модели и даже роботы, способные точно копировать ориентирование пустынного муравья при помощи поляризованного света (рис. 15.17).



Рис. 15.17. Мобильный робот, известный как Sahabot, разработанный Венером с коллегами. На роботе установлено 6 сенсоров поляризованного света, в виде 3 пар. В каждой паре сенсоры противопоставлены друг другу, что дает им свойства, аналогичные свойствам нейронов, показанных на рис. 15.18А. Каждая пара может быть повернута в определенном направлении. Робот способен ориентироваться при помощи поляризованного света, с успехом воспроизводя поведение муравья. Например, если экспериментатор при помощи дистанционного управления проведет робота по извилистому маршруту, робот способен сам вычислить кратчайший путь к начальной точке. Подобного рода модели демонстрируют принципиальную возможность расчета такой траектории, хотя, конечно, не помогают нам понять, каким же образом подобные расчеты осуществляются в ЦНС муравья.

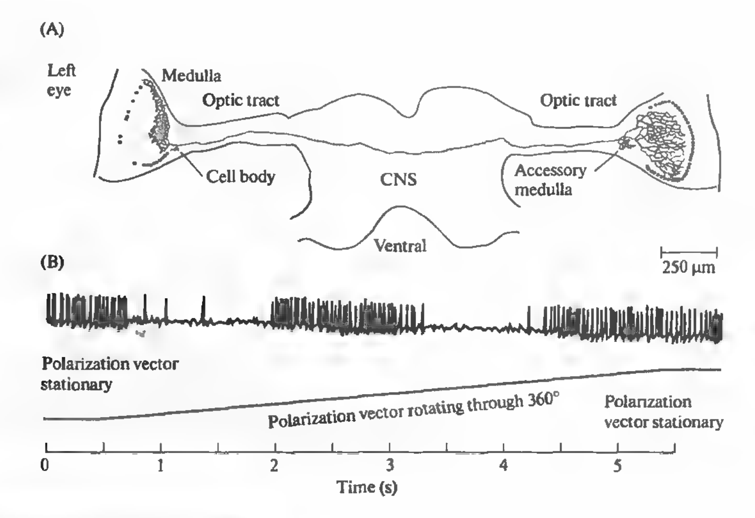
Fig. 15.17. Mobile Robot Known as Sahabot devised by Wehner and his associates. This robot is equipped with six polarized light sensors arranged in pairs. Each pair forms a polarization opponent unit with properties resembling those of the neuron shown in Figure 15.18A. Each can be tuned to a specific evoked direction. The robot is able to navigate with this polarized light compass, successfully recreating the behavior of the ant. For example, it can be driven in a tortuous path and can then compute the shortest way back to the starting point. Such models illustrate the possibility of computing trajectories in this way but do not, of course, provide evidence that this is the system the ant uses. (After Wehner, 1997; photograph kindly provided by R. Wehner.)

Так как нейроны муравья очень малы, электрические сигналы были отведены Лабхартом с коллегами от интернейронов сверчка, получающих сигналы от фоторецепторов поляризованного света[80]. Как и у муравьев и ракообразных, микроворсинки двух фоторецепторов сверчка расположены ортогонально: их отростки направляются к интернейрону с информацией о векторе поляризации света. Электрические сигналы этих клеток показаны на рис. 15.18. Эти сигналы в точности копируют сигналы, предсказанные на основе поведенческих экспериментов с поляризованным светом.

Поляризованный свет и «скрученные» фоторецепторы пчел (twisted photoreceptors)

Рецепторы поляризованного света есть и у пчел. С одной стороны, упорядоченное расположение микроворсинок позволяет пчеле ориентироваться по поляризованному свету. Но при различении цветов поляризация может вызывать определенные сложности. Во время полета пчеле нужно хорошо различать цветы по окраске их лепестков. Листья и лепестки, однако, сильно различаются по своей способности отражать свет, что определяется свойствами их поверхностей, в зависимости от содержания восковидных веществ. Гладкие и лоснящиеся листья отражают поляризованный свет лучше, чем матовые. Следовательно, угол, под которым лист или лепесток рассматриваются и под которым на них падает свет, будет влиять на величину и направление отраженного поляризованного света.

Зрительные пигменты, необходимые для цветового зрения, располагаются у пчелы (как и у муравья) в микроворсинках специфических рецепторных клеток трех типов, чувствительных к зеленому, синему и ультрафиолетовому спектрам. У пчелы, как и у муравья, зрительные пигменты находятся в стереотипных параллельно расположенных рабдомах. Из-за переменных неучтенных составляющих поляризованного света, сигналы цветовосприятия становятся неоднозначными, так как точность различения цвета зависит не только от длины волны, но и от относительного поглощения света разными классами цветовых фоторецепторов. Как писали Венер и Бернард[81]: «Это означало бы, что для пчелы цветовые оттенки любой части растения меняются, если приближающаяся пчела вдруг меняет направление своего полета и, следовательно, направление обзора, — эффект совсем нежеланный. Например, зигзагообразно кружа над опушкой, где имеется



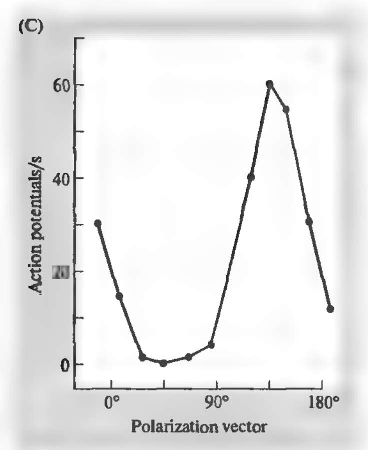


Рис. 15.18. Электрические ответы интернейронов, получающих сигналы с фоторецепторов поляризованного света в ЦНС сверчка. Интернейроны сверчка довольно большие, и в них можно ввести микроэлектрод для регистрации. (A) Реконструкция интернейрона при внутриклеточном введении нейробиотина. Данный нейрон получает сигналы от фоторецепторов левого глаза. (B) Сигналы в таком интернейроне при вращении вектора поляризованного света на 360 градусов. (C) Графическое представление сигналов в зависимости от вектора поляризации (ось абсцисс).

Fig. 15.18. Electrical Responses of Polarization-Sensitive Interneurons in cricket CNS. These interneurons are large enough to be impaled by microelectrodes. (A) Reconstruction of the interneuron stained by intracellular application of neurobiotin. This neuron receives its input from the left eye. (B) Responses of a neuron of this type to polarized light when the vector is rotated through 360°. (C) Graphical representation of responses plotted against polarization vector. (After Labhart, 1988.)

множество поверхностей листьев с разной степенью наклона, пчела видела бы удивительно пестрый фейерверк ложных цветов, делающий исключительно трудным, если вообще возможным, процесс определения истинных цветов растений». Чтобы избежать этой проблемы (которая, конечно, не может касаться нас, так как мы не способны воспринимать ориентацию поляризованного света), в сетчатке пчелы расположены «скрученные» рецепторные клетки. При помощи световой и электронной микроскопии было обнаружено, что фоторецепторы скручены вокруг своих продольных осей, что приводит к последовательному смещению в ориентации микроворсинок (рис. 15.19). Виток, величина которого составляет порядка 1°/мкм, приводит к тому, что микроворсинки более не находятся строго параллельно друг другу по всей глубине сетчатки. Поэтому фоторецепторы больше не воспринимают только поляризованный свет определенной ориентации. В течение многих лет изогнутая форма фоторецепторов казалась анатомической особенностью, не имеющей какого-либо значения.

Глаз пчелы, как и муравья, содержит обычные «нескрученные» рецепторы в зоне дорзального ободка. Они реагируют на плоско-поляризованный свет и, значит, могут быть использованы для навигации и ориентирования. Как говорил Лэнд: «Нельзя не поразиться простоте и многосторонности инженерных решений природы в оптике»[82].

Рис. 15.19. Анатомическое строение завитков «скрученных» фоторецепторов глаза пчелы, благодаря которым минимизируется влияние поляризованного света на цветовосприятие. Ориентация фоторецепторов показана на вставке. Угол поворота увеличивается в направлении от поверхности вглубь. На графике показаны угловые смещения фоторецепторов вокруг поперечной оси (TRA) (ордината), расположенных на разной глубине омматидия (абсцисса). Рецепторы дорзального ободка глаза, чувствительные к поляризованному свету, не имеют завитков (серые кружки). В результате скручивания фоторецепторы, расположенные вне области дорзального ободка, не способны воспринимать угол поляризации падающего света. ВМ = базальная мембрана сложного глаза пчелы.

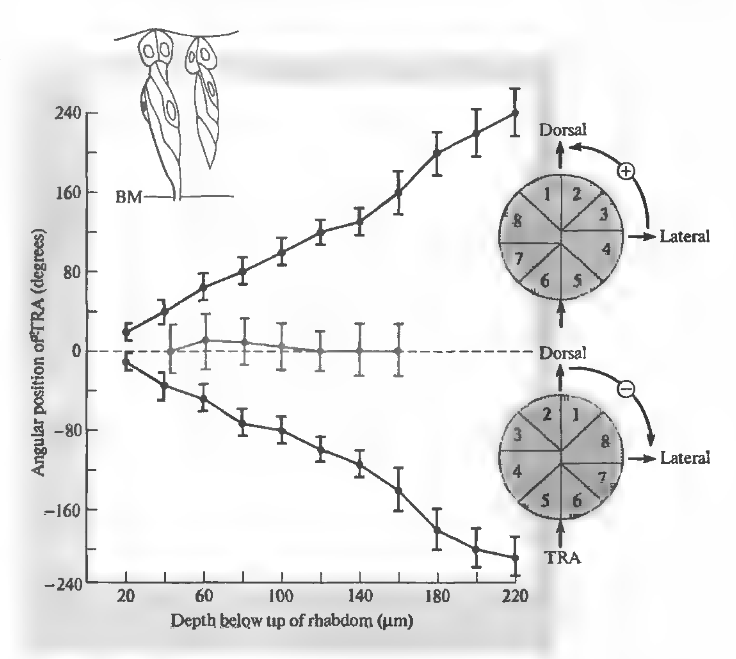


Fig. 15.19. Anatomical Twist in Bee Photoreceptors through which the influence of polarized light is minimized. The arrangement of the photoreceptors is shown (in the inset) with twists evident at increasing depth from the surface. In the graph the depth below the tip of the ommatidium is plotted (abscissa) against the angular position of the transverse axis (TRA) of the photoreceptor (ordinate). Receptors in the dorsal rim of the eye, which is sensitive to polarized light, show no twist (grey circles). As a result of the twist, a photoreceptor outside the dorsal rim does not respond selectively to polarized light of a particular orientation. BM = basement membrane of compound eye. (After Wehner and Bernard, 1993.)

Использование магнитных полей пчелами в навигации

Кроме зрительных ориентиров и поляризованного света[83)], пчелы также способны использовать магнитный компас для ориентирования при поиске цели. Это было показано в экспериментах Колетта и его коллег, в которых они приучали пчел собирать сахар из маленькой бутылочной пробки, расположенной на доске[84)]. Для облегчения ориентирования пчел они использовали черный цилиндр, который помещался на строго определенном расстоянии от бутылочной пробки и под постоянным углом. Цилиндр и сироп перемещались в разные места доски между сериями экспериментов. Периодически бутылочную пробку вообще убирали, оставляя только цилиндр. То, каким образом пчела производила поиск сиропа и возвращалась в улей, регистрировалось при помощи видеокамеры. На рис. 15.20 показана траектория пчелы по мере приближения и затем удаления от цилиндра (черный кружок) и источника пищи (крестики). Очевидно, что прежде чем приземлиться, пчела повернулась по направлению к югу, и тотчас после взлета снова ориентировалась на юг. Благодаря этому она видела зрительный ориентир и приманку (сахарный сироп) каждый раз под определенным углом. Объяснить подобное поведение только ориентированием пчелы по звездному небу нельзя. Пчела поворачивается строго на юг и во время дождя, при закрытом облаками небе, когда невозможно использовать небо в качестве ориентира. На основе этих наблюдений можно сделать вывод, что пчела каким-то образом способна различать, где юг, север, восток или запад.

То, что пчелы чувствительны к магнитным полям, было показано в опытах с пчелами при накрытии их брезентом и использовании магнитных полей, смещающих магнитный северный полюс. Пчелы по прежнему ориентировались на «юг», но это направление было «югом» данного (искусственного) магнитного поля. То, каким образом изменение магнит-

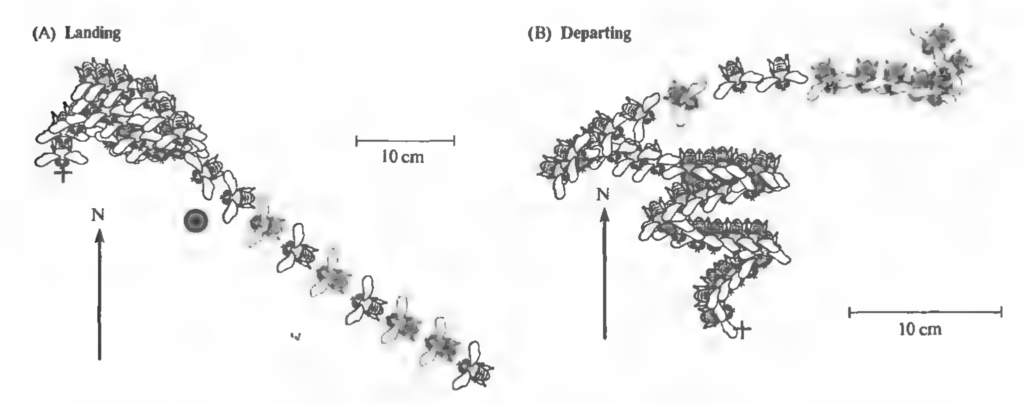


Рис. 15.20. Траектории полета пчелы при приземлении у источника пищи и при взлете. Цилиндр (черный кружок) установлен вблизи от источника пищи, отмеченного крестиком. (А) Сначала (в правом нижнем углу) пчела летит строго по прямой к цилиндру, используя его в качестве ориентира. Однако потом, при подлете к источнику пищи непосредственно перед приземлением у кормушки, она поворачивается строго на юг. (В) При взлете пчела сначала зигзагообразно движется в направлении на север, по постепенно увеличивающемуся радиусу, при этом голова ее ориентирована на юг.

Fig. 15.20. Trajectory of a Bee landing at a food source and departing from it. A cylinder (black circle) is mounted close to the food source indicated by the cross. (A) The orientation of the bee as it arrives at the bottom right of the frame is toward the cylinder, to which it flies in a straight line. Thereafter, it flies to the food source but turns to face south just before landing on the feeder. (B) As the bee departs, it flies north in arcs of increasing radius while it faces south. (After Collett and Baron, 1994.)

ного поля приводит к изменению поведения и распознавания пчелою образов, до сих пор неизвестно. Подобного рода сенсорные механизмы отсутствуют у человека, но имеются у таких животных, как птицы, черепахи и у некоторых беспозвоночных.

§ 4. Зачем нужно изучать нервную систему беспозвоночных?

Много раз в этой книге, в том числе на множестве примеров из этой главы, мы могли убедиться, что нервная система беспозвоночных служила ключевым фактором в исследовании огромного диапазона вопросов, посвященных биофизике, клеточным аспектам биологии и развитию нервных клеток. Удивительно, что фундаментальные механизмы развития и функционирования НС остаются очень схожими от вида к виду в процессе эволюции. Довольно часто в экспериментах, выполненных на беспозвоночных, получали данные, необходимые, чтобы начать изучение данных проблем у млекопитающих. Например, большой рывок в развитии техники тонких срезов головного мозга млекопитающих (slice technique) был сделан благодаря работам, выполненным на ганглиях беспозвоночных, где можно разглядеть в микроскоп отдельные нейроны во время проведения среза. Работы Хартлайна по исследованию глаза мечехвоста (horseshoe crab) стали ключевым стимулом для работ Куффлера на сетчатке кошки[85, 86]. В то же самое время тщетно надеяться понять, каким же образом зрительные корковые зоны обезьян осуществляют свои функции, при помощи экспериментов с беспозвоночными.

В чем же тогда «польза» от подобного рода исследований по навигации пчел и муравьев? Во-первых, можно предположить, что, хотя мы и не способны воспринимать поляризованный свет и магнитные поля, принципы, используемые беспозвоночными для анализа сенсорной информации и перевода их в определенного рода двигательные команды, так или иначе все равно используются в нервных системах более высокоразвитых организмов. Во-вторых, работы на беспозвоночных иллюстрируют общую позицию биологии: т. е. нейробиология занимается изучением не только головного мозга, но и другими широкими проблемами. И, конечно, есть особая прелесть в том, чтобы понять, как крохотный мозг пиявки, пчелы или муравья способен выполнять изумительные сложнейшие расчеты, без которых особь не смогла бы выжить.

Выводы

- Беспозвоночные демонстрируют большое разнообразие сложных типов поведения.
- Свойства нейронов и глиальных клеток беспозвоночных аналогичны свойствам клеток позвоночных.
- НС беспозвоночных состоит из сотен или тысяч нейронов.
- Каждый вид беспозвоночных имеет определенные преимущества для изучения тех или иных вопросов нейробиологии.
- Свойства отдельных нервных клеток и синапсов можно использовать для объяснения поведения животного и его изменений.
- Объективное изучение поведения пролило свет на многие фундаментальные принципы нейробиологии.
- Не все работы, выполняемые на ЦНС беспозвоночных, непременно имеют цель понять механизмы работы мозга человека. Некоторые проблемы беспозвоночных сами по себе привлекательны для изучения.

Рекомендуемая литература

Обзоры

◇ Calabrese, R. L. 1998. Cellular, synaptic, network, and modulatory mechanisms involved in rhythm generation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 710–717.

◇ Collett, T. S. 1996. Insect navigation en-route to the goal—Multiple strategies for the use of landmarks. *J. Exp. Biol.* 199: 227–235.

◇ Neurobiology and development of the leech (Special Issue). 1995. *J. Neurobioi.* 27 (Pt. 3).

◇ Wehner, R. 1994. The polarization-vision project: Championing organismic biology. *Fortschr. Zool.* 31: 11–53.

Статьи

◇ Antonov, I., Kandel, E. R., and Hawkins, R. D. 1999. The contribution of facilitation of monosynaptic PSPs to dishabituation and sensitization of the *Aplysia* siphon withdrawal reflex. *J. Neurosci.* 19: 10438–10450.

o Baccus, S. A. 1998. Synaptic facilitation by reflected action potentials: Enhancement of transmission when nerve impulses reverse direction at axon branch points. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8345–8350.

◇ Bruns, D., and Jahn, R. 1995. Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* 377: 62–65.

◇ Collett, T. S., and Baron, J. 1994. Biological compasses and the coordinate frame of landmark memories in honeybees. *Nature* 368: 137–140.

◇ Gelperin, A. 1999. Oscillatory dynamics and information processing in olfactory systems. *J. Exp. Biol.* 18: 1855–1864.

◇ Gu, X. 1991. Effect of conduction block at axon bifurcations on synaptic transmission to different postsynaptic neurones in the leech. *J. Physiol.* 441: 755–778.

◇ Lewis, J. E., and Kristan, W. B., Jr. 1998. Quantitative analysis of a directed behavior in the medicinal leech: Implications for organizing motor output. *J. Neurosci.* 18: 1571–1582.

◇ Modney, B. K., Sahley, C. L., and Muller, K. J. 1997. Regeneration of a central synapse restores nonassociative learning. *J. Neurosci.* 17: 6478–6482.

◇ Muller, M., and Wehner, R. 1994. The hidden spiral: Systematic search and path integration in desert ants, Cataglyphis fortis. *J. Comp. Physiol.* [*A*] 175: 525–530.

◇ Wang, H., and Macagno, E. R. 1997. The establishment of peripheral sensory arbors in the leech: In vivo time-lapse studies reveal a highly dynamic process. *J. Neurosci.* 17: 2408–2419.

◇ Wehner, R., and Bernard, G. D. 1993. Photoreceptor twist: A solution to the false-color problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4132–4135.

Цитированная литература

1. Hodgkin, J. 1999. *Cell* 98: 277–280.
2. Boncinelli, E., Mallamaci, A., and Broccoli, V. 1998. *Adv. Genet.* 38: 1–29.
3. Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W. J. 1995. *Science* 267: 1788–1792.
4. Staras, K., Kemenes, G., and Benjamin, P. R. 1999. *J. Neurophysiol.* 81: 1261–1273.
5. Garcia, U., et al. 1994. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14: 71–88.
6. Reichert, H., and Boyan, G. 1997. *Trends Neurosci.* 20: 258–264.
7. Edwards, J. S. 1997. *Brain Behav. Evol.* 50(1): 8–12.
8. Pearson, K. G. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 786–791.

9. Engel, J. E., and Hoy, R. R. 1999. *J. Exp. Biol.* 202: 2797–2806.
10. Kandel, E. R. 1979. *Behavioral Biology of* Aplysia. W. H. Freeman, San Francisco.
11. Muller, K. J., Nicholls, J. G., and Stent, G. S. (eds.). 1981. *Neurobiology of the Leech.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
12. Alkon, D. 1987. *Memory Traces in the Brain.* Cambridge University Press, Cambridge.
13. Atwood, H. L. (ed.). 1982. *Biology of Crustacea,* Vol. 3. Academic Press, New York.
14. Beadle, D. J., Lees, G., and Kater, S. B. 1988. *Cell Culture Approaches to Invertebrate Neuroscience.* Academic Press, London.
15. Payton, W. B. 1981. In *Neurobiology of the Leech.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 27–34.
16. Kuffler, S. W., and Potter, D. D. 1964. *J. Neurophysiol.* 27: 290–320.
17. Stent, G. S., and Weisblat, D. 1982. *Sci. Am.* 246(1): 136–146.
18. Weisblat, D. A., et al. 1999. *Curr. Top. Dev. Biol.* 46: 105–132.
19. Calabrese, R. L. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8(6): 710–717.
20. Szczupak, L., et al. 1998. *J. Exp. Biol.* 201: 1895–1906.
21. Catarsi, S., and Drapeau, P. 1996. *Cell. Mol. Neurobiol.* 16: 699–713.
22. Kleinhaus, A. L., and Angstadt, J. D. 1995. *J. Neurobiol.* 27: 419–433.
23. Yu, X., Nguyen, B., and Friesen, W. O. 1999. *J. Neurosci.* 19: 4634–4643.
24. Thompson, W. J., and Stent, G. S. 1976. *J. Comp. Physiol.* 111: 309–333.
25. Kristan, W. B. 1983. *Trends Neurosci.* 6: 84–88.
26. Coggeshall, R. E., and Fawcett, D. W. 1964. *J. Neurophysiol.* 27: 229–289.
27. Nicholls, J. G., and Baylor, D. A. 1968. *J. Neurophysiol.* 31: 740–756.
28. Stuart, A. E. 1970. *J. Physiol.* 209: 627–646.
29. Lockery, S. R., and Kristan, W. B., Jr. 1990. *J. Neurosci.* 10: 1816–1829.
30. Blackshaw, S. E. 1981. *J. Physiol.* 320: 219–228.
31. Yau, K. W. 1976. *J. Physiol.* 263: 513–538.
32. Wang, H., and Macagno, E. R. 1997. *J. Neurosci.* 17: 2408–2419.
33. Huang, Y., et al. 1998. *J. Comp. Neurol.* 397: 394–402.
34. Blackshaw, S. E., and Nicholls, J. G. 1995. *J. Neurobiol.* 27: 267–276.
35. Blackshaw, S. E., and Thompson, S. W. 1988. *J. Physiol.* 396: 121–137.
36. Bowling, D., Nicholls, J. G., and Parnas, I. 1978. *J. Physiol.* 282: 169–180.
37. Blackshaw, S. E., Nicholls, J. G., and Parnas, I. 1982. *J. Physiol.* 326: 261–268.
38. Muller, K. J., and McMahan, U. J. 1976. *Proc. R. Soc. Lond. B* 194: 481–499.
39. French, K. A., and Muller, K. J. 1986. *J. Neurosci.* 6: 318–324.
40. Macagno, E. R., Muller, K. J., and Pitman, R. M. 1987. *J. Physiol.* 387: 649–664.
41. Nicholls, J. G., and Purves, D. 1972. *J. Physiol.* 225: 637–656.
42. Thorogood, M. S., Almeida, V. W., and Brodfuehrer, P. D. 1999. *J. Comp. Neurol.* 405: 334–344.
43. Bruns, D., and Jahn, R. 1995. *Nature* 377: 62–65.
44. Nadim, F., and Calabrese, R. L. 1997. *J. Neurosci.* 17: 4461–4472.
45. Muller, K. J., and Nicholls, J. G. 1974. *J. Physiol.* 238: 357–369.
46. Reyes, A., et al. 1998. *Nature Neurosci.* 1(4): 279–285.
47. Hickie, C., Cohen, L. B., and Balaban, P. M. 1997. *Eur. J. Neurosci.* 9: 627–636.
48. Walters, E. T., and Cohen, L. B. 1997. *Invertebr. Neurosci.* 3: 15–25.
49. Kristan, W. B., Jr., Lockery, S. R., and Lewis, J. E. 1995. *J. Neurobiol.* 27: 380–389.
50. Lewis, J. E., and Kristan, W. B., Jr. 1998. *Nature* 391: 76–79.
51. Ayali, A., and Harris-Warrick, R. M. 1999. *J. Neurosci.* 19: 6712–6722.
52. Bartos, M., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 6650–6660.
53. Elson, R. C., et al. 1999. *J. Neurophysiol.* 82: 115–122.
54. Nicholls, J. G., and Wallace, B. G. 1978. *J. Physiol.* 281: 157–170.
55. Fernandez-de-Miguel, F., and Drapeau, P. 1995. *J. Neurobiol.* 27: 367–379.
56. Grossman, Y., Parnas, I., and Spira, M. E. 1979. *J. Physiol.* 295: 307–322.
57. Gu, X. 1991. *J. Physiol.* 441: 755–778.
58. Gu, X. N., Muller, K. J., and Young, S. R. 1991. *J. Physiol.* 441: 733–754.
59. Baccus, S. A. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8345–8350.
60. Barron, D. H., and Matthews, B. H. C. 1935. *J. Physiol.* 85: 73–103.
61. Tsubokawa, H., and Ross, W. N. 1997. *J. Neurosci.* 17: 5782–5791.
62. Glover, J. C., and Kramer, A. P. 1982. *Science* 216: 317–319.
63. Brodfuehrer, P. D., et al. 1995. *J. Neurobiol.* 27: 403–418.
64. Muller, K. J., and Carbonetto, S. 1979. *J. Comp. Neurol.* 185: 485–516.
65. Sahley, C. L., et al. 1994. *J. Neurosci.* 14: 6715–6721.
66. Elliott, E. J., and Muller, K. J. 1983. *J. Neurosci.* 3: 1994–2006.
67. Modney, B. K., Sahley, C. L., and Muller, K. J. 1997. *J. Neurosci.* 17: 6478–6482.

68. Ehrlich, J. S., et al. 1992. *J. Neurobiol.* 23: 270–279.
69. Antonov, I., Kandel, E. R., and Hawkins, R. D. 1999. *J. Neurosci.* 19: 10438–10450.
70. Wehner, R., and Menzel, R. 1990. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 403–414.
71. Wehner, R. 1994. *Fortschr. Zool.* 31: 11–53.
72. Wehner, R. 1997. In *Orientation and Communication in Arthropods.* Birkhauser, Basel, Switzerland, pp. 145–185.
73. Collett, M., Collett, T. S., and Wehner, R. 1999. *Curr. Biol.* 9: 1031–1034.
74. Wehner, R., Marsh, A. C., and Wehner, S. 1992. *Nature* 586–587.
75. Muller, K. J. 1973. *J. Physiol.* 232: 573–595.
76. Muller, K. J. 1973. *J. Physiol.* 232: 573–595.
77. Zollikofer, C., Wehner, R., and Fukushi, T. 1995. *J. Exp. Biol.* 198: 1637–1646.
78. Collett, M., et al. 1998. *Nature* 394: 269–272.
79. Muller, M., and Wehner, R. 1994. J. Comp. Physiol. [A] 175: 525–530.
80. Labhart, T. 1988. *Nature* 331: 435–437.
81. Wehner, R., and Bernard, G. D. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4132–4135.
82. Land, M. F. 1993. *Nature* 363: 581–582.
83. Lehrer, M., and Collett, T. S. 1994. *J. Comp. Physiol. [A]* 175: 171–177.
84. Collett, T. S., and Baron, J. 1994. *Nature* 368: 137–140.
85. Hartline, H. K. 1940. *Am. J. Physiol.* 130: 690–699.
86. Kuffler, S. W. 1953. *J. Neurophysiol.* 16: 37–68.

Глава 16

Вегетативная (автономная) нервная система

Вегетативная (автономная) нервная система управляет важнейшими функциями тела позвоночных. В частности, нейроны вегетативной нервной системы иннервируют мышцы глаз, легких, кишечника, кровеносных сосудов, мочевого пузыря, половых органов и матки. Они регулируют секрецию желез, кровяное давление, частоту сердцебиений, величину сердечного выброса и температуру тела, а также поступление в организм воды и пищи. В противоположность быстротечным процессам проведения и мышечного сокращения, которые требуются для обеспечения движений конечностей, «поддерживающие» или «вегетативные» функции медленнее развиваются, дольше длятся и обычно менее целенаправлены.

Вегетативная нервная система состоит из четырех различающихся между собой нейронных образований. **Симпатический** отдел включает нейроны, аксоны которых выходят из спинного мозга в составе вентральных корешков, образуемых грудными и поясничными сегментами. Они формируют синапсы на нервных клетках, находящихся в превертебральных и паравертебральных симпатических ганглиях, расположенных соответственно вблизи или вдали от спинного мозга, а также на хромаффинных клетках мозгового слоя надпочечников. Симпатические постганглионарные аксоны немиелинизированы и проходят на большие расстояния к зонам иннервации. **Парасимпатический** отдел включает аксоны, выходящие в составе определенных черепномозговых и крестцовых спинномозговых нервов. Они формируют синапсы в ганглиях, расположенных вблизи органов-мишеней. Парасимпатические постганглионарные аксоны, как правило, короче, чем аксоны нейронов симпатической нервной системы. Третий, значительно более сложно организованный отдел, включающий миллионы нервных клеток, расположенных в стенке кишечника, — это **энтеральная** нервная система. Четвертый отдел объединяет нейроны в спинном мозге, гипоталамусе и стволе мозга. В составе ЦНС границы между вегетативной и соматической системами достаточно условны.

Синаптическая передача в вегетативной нервной системе отличается чрезвычайным разнообразием, включая все известные медиаторы. Принципы передачи и интеграции, установленные на вегетативных синапсах, включают химическую природу синаптической передачи, повторный захват медиатора, ауторецепторы на пресинаптических нервных окончаниях, совместное выделение более чем одного медиатора в одиночной терминали и участие вторичных посредников. Медиаторы, используемые в вегетативных ганглиях, включают ацетилхолин, действующий как на никотиновые, так и на мускариновые рецепторы, пептиды и дофамин. Постганглионарные парасимпатические нервные окончания секретируют ацетилхолин в качестве первичного передатчика, который действует на мускариновые рецепторы в органах-мишенях. Постганглионарные симпатические нейроны секретируют в качестве первичных медиаторов норадреналин, адреналин, ацетилхолин, пурины и пептиды. Симпатические и парасимпатические нейроны помимо основного медиатора высвобождают АТФ и пептиды. Хотя довольно многое уже известно о вегетативной регуляции активности в гладкомышечных и железистых клетках, значительно меньше информации доступно о центральных интегративных механизмах, регулирующих вегетативные функции.

Периодический 24-часовой цикл активности, известный как циркадный ритм, оказывает влияние на многие вегетативные функции. Эксперименты, в которых регистрация активности производилась от специфических нейронов гипоталамуса, позволили выявить один из клеточных механизмов, которые генерируют ритм. Медленные повышения внутриклеточной концентрации хлора в дневные часы приводят к тому, что торможение, обусловленное гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК), преобразуется в возбуждение. За счет этого импульсная активность нейронов повышена в течение дня и снижена ночью.

Название «автономная» подразумевает независимую систему, которая действует самостоятельно. Отчасти это справедливо. Вегетативная нервная система контролирует кровеносные сосуды, сердце и гладкую мускулатуру кишечника, бронхов, мочевого пузыря и селезенки без участия нашего сознания. Простым усилием воли невозможно увеличить диаметр зрачка либо кровоток в собственном пальце. Можно, конечно, добиться этого обходным путем, используя некоторые уловки: так, волнение, возникающее в результате преднамеренного размышления о предстоящем экзамене, о визите к зубному врачу или о кинозвезде, может усилить частоту сердцебиений.

На практике функционирование вегетативной нервной системы тесно связано с произвольными движениями. Физическая нагрузка приводит к адекватному притоку крови к мышцам и к активации потовых желез; подъем из положения лежа требует такого перераспределения кровоснабжения, которое обеспечивает приток крови к головному мозгу. Потребление пищи перенаправляет кровь к желудку и кишечнику. Включая или выключая активность в повсеместно распределенных группах иннервируемых ею клеток, вегетативная нервная система выполняет работу по поддержанию и обеспечению функций тела. Приоритеты задаются головным мозгом, запускающим процессы пищеварения, размножения, мочеиспускания, дефекации или световой адаптации, которые, однако реализуются механизмами, не контролируемыми на уровне нашего сознания. Ключевыми проблемами, заботящими человечество, являются расстройства вегетативной нервной системы, приводящие к таким явлениям, как астма, кишечная непроходимость, диарея, язвенная болезнь, гипертония, сердечные заболевания, инсульт, задержка мочи (или ее недержание).

Недавние эксперименты и классические работы по вегетативной нервной системе представляют настолько широкую и разнообразную область, что ее всесторонний обзор невозможен в рамках данной главы. На самом деле, целые учебники[1)–3)] и специализированные журналы[4)–5)] посвящены важным функциям вегетативной нервной системы. Имеется большое количество информации, касающейся механизмов, управляющих энтеральной нервной системой и мочевым пузырем, диаметром зрачка, секрецией желез и хромаффинных клеток надпочечников, центральной регуляцией дыхания, температуры, веса тела, аппетита и размножения[6)–11)]. В этой главе, как и в других, основное внимание уделено выборочным примерам, которые иллюстрируют клеточные, молекулярные и интегративные механизмы.

Ниже будет показано, что хотя сейчас уже многое известно о вегетативной нервной системе, остается еще много открытых вопросов, в частности, по поводу интегративных механизмов в структурах, расположенных в ЦНС. Различия между вегетативной и соматической системами недостаточны для того, чтобы четко и строго разграничить их на уровне ЦНС. Поэтому удобнее начать с краткого описания основных свойств периферической вегетативной нервной системы.

§ 1. Непроизвольно управляемые функции

Симпатическая и парасимпатическая нервные системы

Основные анатомические особенности показаны на рис. 16.1. Фактически все органы тела снабжены вегетативной иннервацией. Даже волокна скелетной мускулатуры, которые не получают прямой иннервации, зависят от вегетативной нервной системы; их кровоснабжение регулируется в соответствии с потребностями. Симпатические преганглионарные нейроны расположены в интермедиолатеральном роге спинного мозга в сегментах с T1 по L3. Их миелинизированные аксоны выходят через вентральные корешки, образуя синапсы в ганглиях, расположенных как рядом с позвоночным столбом, так и на большем удалении (рис. 16.1А). Из этих ганглиев к тканям идут уже немиелинизированные волокна. В противоположность этому, парасимпатический выход ограничен черепномозговыми нервами III, VII, IX и X пар и крестцовыми корешками S2, S3 и S4 (рис. 16.1В). Парасимпатические ганглии расположены вблизи от иннервируемых тканей либо непосредственно в них самих. Следовательно, парасимпатический миелинизированный преганглионарный аксон длинный, тогда как немиелинизированный постганглионарный аксон — короткий.

Результаты действия двух систем часто, хотя и не всегда, антагонистичны (табл. 16.1). Например, возбуждение симпатических нейронов приводит к расширению зрачка, повышению сердечного ритма и ослаблению

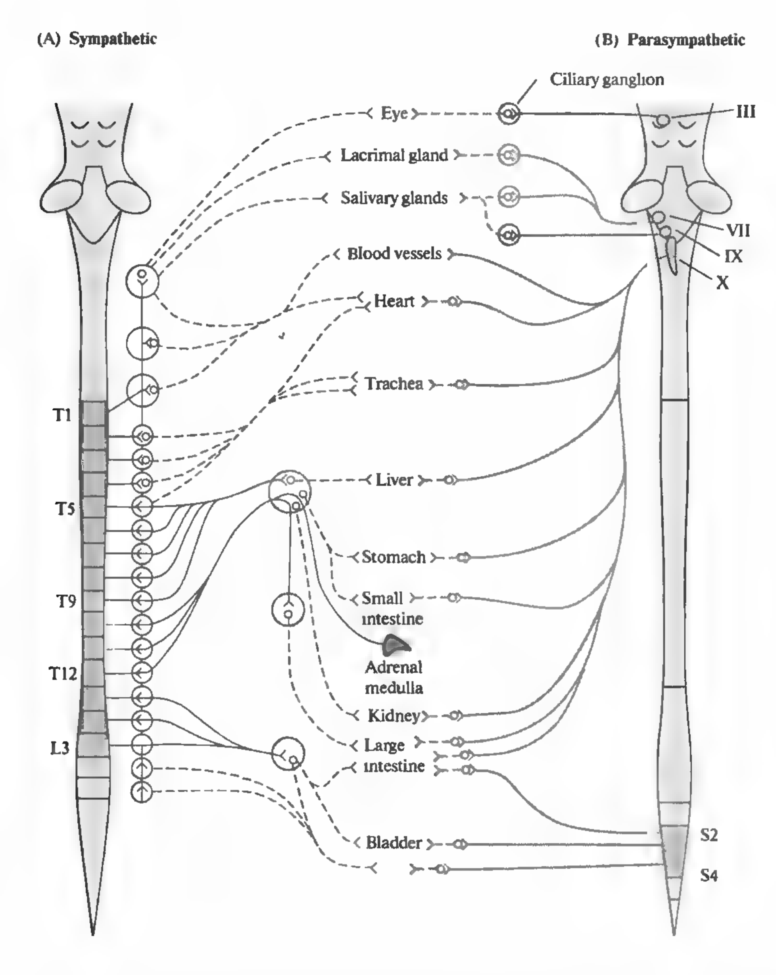


Рис. 16.1. Вегетативная нервная система и иннервируемые ею органы-мишени. (А) Основные особенности симпатической нервной системы, включая паравертебральные ганглии, периферические ганглии и мозговой слой надпочечников. (В) Более ограниченный выход парасимпатической нервной системы и иннервируемые ею органы.

Fig. 16.1. The Autonomic Nervous System and the target organs that it innervates. (A) Principal features of the sympathetic nervous system, including the paravertebral ganglia, peripheral ganglia, and adrenal medulla. (B) The more restricted output from the parasympathetic nervous system and the targets that it innervates. Solid lines are myelinated preganglionic axons; dashed lines are unmyelinated postganglionic axons.

кишечной моторики. Парасимпатическая активация вызывает противоположные эффекты: сужение зрачка, замедление ритма сердца и усиление моторики кишечника. С другой стороны, секреция желез может быть усилена при активации каждой из этих систем. Обе системы могут вызвать сокращение или расслабление гладких мышц, в зависимости от того, какой медиатор при этом высвобождается, и от того, какого типа рецепторы присутствуют в мышце.

Главное различие между двумя отделами вегетативной системы состоит в том, что симпатическая нервная система имеет тенденцию активироваться как единое целое, вызывая диффузные генерализованные реакции по всему телу. Она характерным образом активируется в условиях испуга, нападения или бегства, а также в процессе интенсивной физической нагрузки. Симптомы хорошо известны: расширенные зрачки, сухость во рту, колотящееся сердце, потение, сильные переживания. Системные эффекты симпатической нейронной активности усиливаются в дальнейшем хромаффинными клетками мозгового слоя надпочечников[12]. Эти клетки являются видоизмененными ганглионарными нейронами. Хромаффинные клетки получают холинергический вход от преганглионарных аксонов и секретируют адреналин, норадреналин, пептиды и АТФ в качестве гормонов, переносимых током крови. Адреналин, циркулирующий в крови, поддерживает и продлевает симпатическую активность. Адреналин, поступающий из симпатических нервных окончаний, может достигать рецепторов гладкой мускулатуры бронхов и связываться с ними; адреналин также связывается с рецепторами

Таблица 16.1. Типичные эффекты адренергической симпатической и холинергической парасимпатической нервных систем.

Table 16.1. Characteristic actions of adrenergic sympathetic and cholinergic parasympathetic nervous systems.

	Effect of		
	Adrenergic sympathetic		Cholinergic parasympathetic
Organ	Action[a]	Receptor[b]	Action
Eye			
Iris			
Radial muscle	Contracts	α_1	—
Circular muscle	—	—	Contracts
Ciliary muscle	(Relaxes)	β	Contracts
Heart			
Sinoatrial node	Accelerates	β_1	Decelerates
Contractility	Increases	β_1	Decreases (atria)
Vascular smooth muscle			
Skin, splanchnic vessels	Contracts	α	—
Skeletal muscle vessels	Relaxes	β_2	—
Nerve endings	Inhibits release	α_2	—
Bronchiolar smooth muscle	Relaxes	β_2	Contracts
Gastrointestinal tract			
Smooth muscle			
Walls	Relaxes	α_1, β_2	Contracts
Sphincters	Contracts	α_1	Relaxes
Secretion	—	—	Increases
Myenteric plexus	Inhibits	α	Activates
Genitourinary smooth muscle			
Bladder wall	Relaxes	β_2	Contracts
Sphincter	Contracts	α_1	Relaxes
Metabolic functions			
Liver	Gluconeogenesis	α/β_2	—
	Glycogenolysis	α/β_2	—

[a] Accounts of the actions of the autonomic nervous system on target organs listed in this table that are not dealt with in this chapter are given in reviews and textbooks of physiology and pharmacology (see references in text).

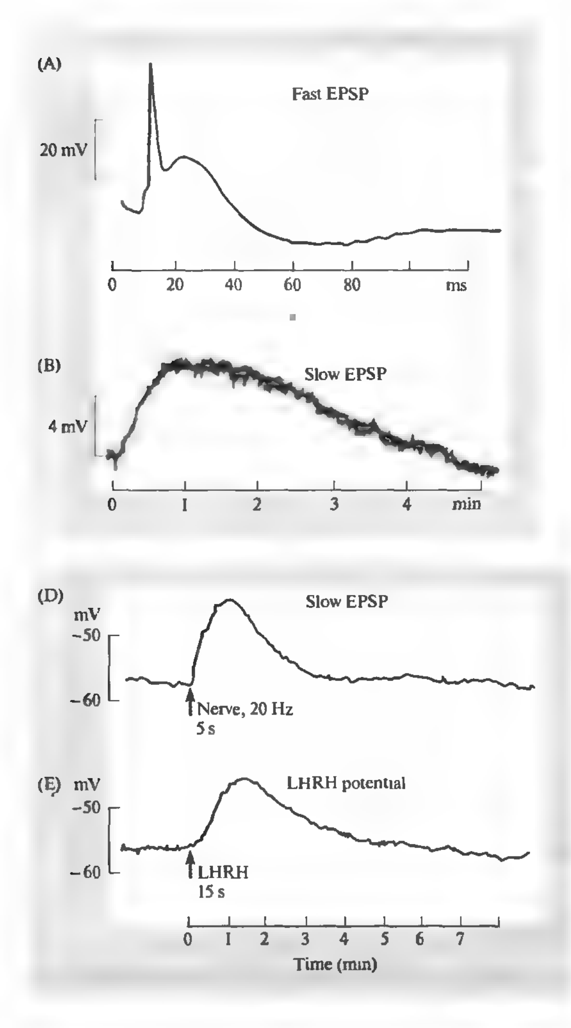
[b] Not all the adrenergic receptors or effector cells are included; purinergic, peptidergic, and cholinergic mechanisms are dealt with in the text. Whereas epinephrine acts on all the adrenergic receptors, norepinephrine is effective on α_1, α_1, and β_1 receptors, but not β_2. The various types of adrenergic and muscarinic receptors are characterized by the specific agonists and antagonists that bind to them, and by their molecular structures.

кровеносных сосудов, которые нечувствительны к норадреналину. В отличие от норадреналина, адреналин может вызывать как расширение, так и сокращение кровеносных сосудов.

В противоположность этому, парасимпатическая нервная система является более избирательной в своей деятельности. Есть существенная выгода в том, что зрачок может сокращаться при ярком освещении, а хрусталик глаза — аккомодироваться для рассматривания соседствующих объектов избирательно, без сопутствующих и весьма несвоевременных сокращений мочевого пузыря либо еще менее уместных парасимпатических эффектов.

Синаптическая передача в симпатических ганглиях

Некоторые механизмы синаптической передачи в вегетативной нервной системе уже были описаны в предыдущих главах (10, 12 и 13). Они включают совместное высвобождение



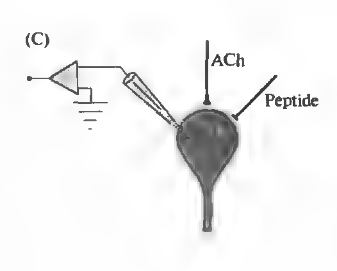


Рис. 16.2. Быстрый и медленный постсинаптические потенциалы в симпатическом ганглии лягушки-быка.

Fig. 16.2. Fast and Slow Synaptic Potentials in Sympathetic Ganglion Cells in a bullfrog. (A) A single stimulus to the preganglionic inputs evokes a large, fast EPSP and an action potential. (B) Trains of stimuli (10/s for 5 s) are required to elicit slow synaptic potentials. Note that the timescale is in minutes instead of milliseconds. (C) Cells in ganglia receive cholinergic and peptidergic inputs, which can be stimulated selectively. (D) Slow excitatory potential evoked by stimulating peptidergic input (20/s for 5 s). As in A, the depolarization lasts several minutes. (E) Application of LHRH to the same neuron by pressure from a micropipette. The peptide mimics the action of the naturally released transmitter. (After Kuffler, 1980.)

многих медиаторов из нервных окончаний, модулирующее действие вегетативных медиаторов, свойства рецепторов, использующих вторичные посредники, и эффекты ацетилхолина и адреналина на сердечную мышцу. Путь, которым такие механизмы взаимодействуют, чтобы обеспечить сигнализацию, наглядно иллюстрируется экспериментами по изучению синаптической передачи в вегетативных ганглиях.

Вегетативные ганглии представляют собой релейные станции, функциональное значение которых не сразу стало очевидным[13]. На первый взгляд механизм прямой передачи поразительно сходен с таковым в скелетном нервно-мышечном соединении. Каждый пресинаптический импульс освобождает ацетилхолин, который действует на никотиновые рецепторы постсинаптической клетки, открывая каналы и вызывая быструю деполяризацию (глава 9)[14, 15]. Как и в нервно-мышечном соединении, одиночный пресинаптический потенциал действия сопровождается аналогичным событием в постсинаптической клетке (рис. 16.2).

Передача в синапсе между преганглионарным аксоном и постсинаптической клеткой, однако, организована значительно сложнее, чем это представлялось по первым результатам. Так, совершенно иная картина возникает при ритмической стимуляции пресинаптических аксонов с частотой, возникающей обыч-

но в живом организме. При этих условиях ганглий уже не является простой передающей станцией, а становится местом сложных взаимодействий. При пачечной активности и продолжительной деполяризации и гиперполяризации в ганглионарных клетках возникают длиннолатентные синаптические потенциалы. Суммируясь, они производят устойчивую подпороговую деполяризацию, сохраняющуюся в течение секунд, минут или даже часов. В процессе деполяризации одиночный пресинаптический потенциал действия может вызвать множественные постсинаптические импульсы. Как быстрые, так и медленные синаптические потенциалы возникают при высвобождении ацетилхолина из пресинаптических нервных окончаний. Как уже упоминалось, быстрый синаптический потенциал является результатом активации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Медленный потенциал обусловлен активацией мускариновых АХ рецепторов, которые связаны с G-белками (глава 10).

Куффлер и коллеги показали, что в возникновении медленного синаптического потенциала участвует второй передатчик[16, 17]. Некоторые пресинаптические аксоны высвобождают декапептид, сходный с релизинг-фактором лютеинизирующего гормона (LHRH). (LHRH известен также под названием GnRH, релизинг-фактор гонадотропина; см. рис. 16.9.) Следовательно, в вегетативных ганглиях нейрональная импульсная активность и возбудимость контролируются как АХ, так и LHRH, секретируемыми пресинаптическими нейронами. Сложное взаимодействие между передатчиками и рецепторами наблюдается также в хромаффинных клетках надпочечников. Эти модифицированные ганглионарные клетки возбуждаются преганглионарными аксонами брыжеечного нерва, который высвобождает АХ и АТФ[18].

Несмотря на кажущуюся сложность, это описание ганглионарной передачи является слишком упрощенным. Интеграция в симпатических и парасимпатических ганглиях модулируется в той или иной степени интернейронами, называемыми SIF-клетками (small intensely fluorescent cells, мелкие интенсивно флюоресцирующие клетки), содержащими катехоламины, а также пресинаптическими окончаниями, которые высвобождают вазоактивный интестинальный пептид (VIP) и энкефалины[19, 20].

М-токи в вегетативных ганглиях

Каков механизм, ответственный за медленную деполяризацию, вызываемую ацетилхолином и LHRH? Этот вопрос был решен Брауном, Адамсом и их коллегами, которые впервые описали необычные калиевые токи, протекающие через «М-каналы» (получившие свое название благодаря взаимодействию с мускариновыми рецепторами)[21)–23]. М-каналы открываются часто на уровне потенциала покоя, внося существенный вклад в калиевую проводимость в состоянии покоя, и вероятность их открывания возрастает при деполяризации. Активация мускариновых рецепторов приводит к *закрыванию* каналов (рис. 16.3, 16.4). Вследствие этого нарушается баланс, существующий при потенциале покоя между входом натрия и выходом калия, и клетка деполяризуется.

М-каналы оказывают сильное влияние на синаптические ответы, вызванные АХ[24]. Одиночный пресинаптический потенциал действия приводит к активации никотиновых рецепторов, вызывая ВПСП, который характеризуется малой длительностью и генерирует не более одного постсинаптического потенциала действия. Длительность ВПСП невелика потому, что синаптическая деполяризация приводит к активации М-каналов, увеличивая таким образом степень реполяризации (см. рис. 16.2). Если при этом активируются также мускариновые рецепторы, то возникающее в результате снижение калиевой проводимости приводит к двум последствиям: во-первых, клетка деполяризуется; во-вторых, существенно возрастает длительность ВПСП, вызванных активацией никотиновых рецепторов. В результате каждый непосредственно вызванный ВПСП остается надпороговым в течение многих миллисекунд и вызывает пачку импульсов (см. рис. 16.4). Возникновение медленных потенциалов, вызванных пептидами, также обусловлено закрыванием М-каналов и оказывает сходное воздействие на синаптическую активность.

После открытия М-каналов в вегетативных ганглиях они были обнаружены также в спинном мозге, гиппокампе и коре головного мозга[25]. МакКиннон, Браун и коллеги клонировали гены субъединиц, входящих в состав калиевых М-каналов[26, 27]. Механизм, обеспечивающий закрывание М-каналов, до конца не изучен, хотя показано, что в нем участвует повышение внутриклеточного уровня каль-

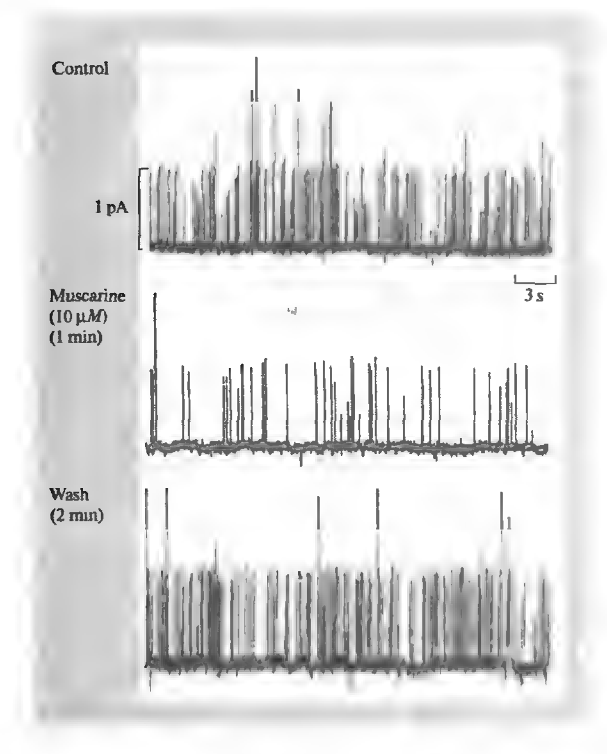


Рис. 16.3. Свойства М-каналов, закрывающихся при аппликации мускарина. Пэтч-отведение от клеток нейробластомы в культуре. Мускарин существенно снижает вероятность открывания каналов.

Fig. 16.3. Properties of M-Channels, which are closed by application of muscarine. The records were made by cell-attached patch recording from a transformed neuroblastoma cell in culture that expressed M-receptors and M-channels. When muscarine was applied, the probability of channel opening was drastically decreased. (After Brown et al. 1993.)

ция, вовлеченное в систему вторичных посредников[28)].

М-каналы оказывают решающее влияние на паттерн импульсной активности в вегетативной нервной системе[29)]. В клетках с большим М-током, в частности, в тех, которые ответственны за расширение зрачка, пресинаптический вход не обладает тонической импульсной активностью, и на выходе частота входящих импульсов воспроизводится приблизительно один к одному. Ответы ганглионарных клеток, таким образом, имеют фазный характер, т. е. импульсы в них возникают лишь в случае поступления внешней команды. Напротив, клетки поясничных ганглиев, которые обеспечивают сокращение сосудов, находятся под постоянным активирующим воздействием пресинаптических входов. Это воздействие подавляет М-токи через мускариновые АХ рецепторы. В результате эти клетки проявляют тоническую активность, частота которой зависит от входа, и производят повышение или снижение тонуса сосудов. Эти результаты соответствуют требованиям прерывистого, эпизодического расширения зрачка в случае необходимости, с одной стороны, и поддержанию регуляции диаметра кровеносных сосудов, с другой. Тонические и фазные разряды вызывают и дополнительные эффекты; они определяют, возможно, какой тип передатчика будет высвобождаться терминалями ганглионарной клетки на ее мишени.

§ 2. Синаптическая передача от постганглионарных аксонов

Хотя АХ является основным медиатором, используемым постганглионарными парасимпатическими аксонами, они одновременно выделяют пептиды (рис. 16.5). Например, АХ, высвобождаемый парасимпатическими аксонами, вызывает секрецию слюнных желез, действуя через мускариновые рецепторы. При высокочастотной стимуляции те же аксоны высвобождают также пептид, называемый вазоактивным интестинальным пептидом (VIP). VIP, изначально открытый в кишечнике и мозге, вызывает вазодилятацию, повышает внутриклеточную концентрацию кальция и усиливает секрецию слюны, причем эти эффекты не блокируются антагонистом мускариновых

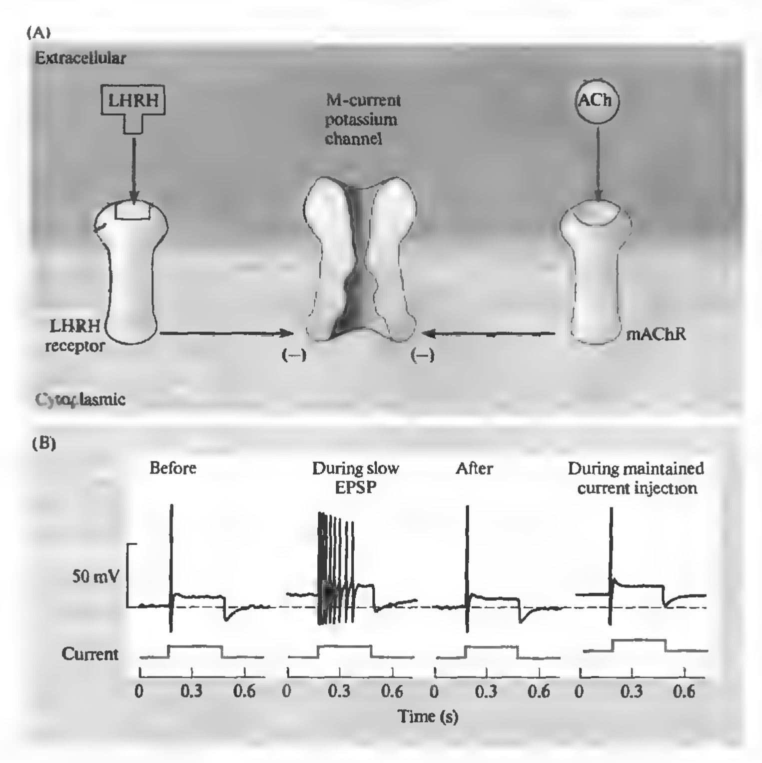


Рис. 16.4. Торможение калиевых токов в клетках симпатического ганглия модулирует ответы на пресинаптическое раздражение. (А) АХ и LHRH, действуя через соответствующие рецепторы, оба тормозят М-токи калиевых каналов. (В) Результатом снижения М-токов во время медленного синаптического потенциала является повышение возбудимости ганглионарной клетки. Деполяризующие стимулы до и после медленного ВПСП вызывают одиночный ПД, а во время медленного ВПСП — серию ПД. Сходная с медленным ВПСП деполяризация клетки, вызванная инъекцией поддерживающего тока, не вызывает такого эффекта.

Fig. 16.4. Inhibition of Potassium Currents in Sympathetic Ganglion Cells modulates responses to presynaptic stimulation. (A) Binding of ACh to muscarinic receptors (mAChR) and binding of LHRH to its receptor both inhibit M-current potassium channels. (B) The effect of the decrease in the M-current during the slow synaptic potential is to increase the excitability of the ganglion cell. Depolarizing current pulses applied through the microelectrode (lower traces) before and after a slow synaptic potential produce a single action potential. During the slow potential, the same current pulse elicits a burst of action potentials. Depolarizing the ganglion cell (to the same extent as occurs during closure of M-channels) by injecting a maintained current has no such effect on the responsiveness of the cell. (After Jones and Adams, 1987.)

рецепторов атропином[30, 31]. Такая передача известна также как неадренергическая и нехолинергическая, или как NANC[32].

Основным медиатором для симпатических постганглионарных нейронов является норадреналин. Однако симпатические аксоны, иннервирующие потовые железы и кровеносные сосуды в скелетной мышце, вместо норадреналина секретируют ацетилхолин[33]. Симпатические нервные волокна также секретируют АТФ и пептиды, высвобождаемые совместно с основными медиаторами. Пространственное распределение некоторых медиаторов, используемых в интестинальных рефлексах, показано на рис. 16.6.

В табл. 16.1 приведены основные области локализации адренергических рецепторов в организме и механизмы их действия. С развитием молекулярной биологии стало ясно, что все адренергические рецепторы, содержащие субъединицы α_1, α_2, β_1 и β_2, так же как и мускариновые АХ рецепторы, сходны по аминокислотной последовательности. Все эти рецепторы состоят из семи трансмембранных сегментов, связаны с G-белками и используют вторичные посредники (главы 10 и 13).

Пуринергическая передача

В серии выдающихся экспериментов Бернсток и его коллеги открыли и описали один из важных классов симпатических медиаторов, включающих производные пуринов — АТФ и аденозин[34]. Терминали некоторых симпатических нервных волокон высвобождают АТФ либо как основной медиатор, либо совместно с норадреналином или ацетилхо-

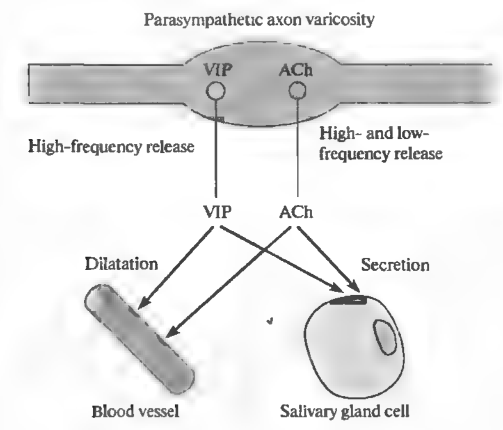


Рис. 16.5. Совместная передача с парасимпатического постганглионарного нейрона, высвобождающего наряду с ацетилхолином вазоактивный интестинальный пептид (VIP). Парасимпатические нервные волокна, иннервирующие слюнные железы, секретируют оба медиатора, которые запасаются в разных везикулах. При низкочастотной стимуляции высвобождается только АХ, а при высокочастотной — оба, вызывая и вазодилятацию, и слюноотделение.

Fig. 16.5. Cotransmission by Parasympathetic Postganglionic Neurons that release both acetylcholine and vasoactive intestinal peptide (VIP). Parasympathetic nerve fibers supplying the salivary gland secrete both transmitters, which are stored in separate vesicles. Stimulation at low frequencies releases acetylcholine but not VIP, while at higher frequencies both transmitters are released, causing vasodilatation and secretion of saliva. (After Burnstock, 1995.)

лином. Эксперименты, в которых было показано, что АТФ является медиатором в симпатической системе, изначально планировались с совершенно иной целью. Бернсток и Холман[35] осуществляли внутриклеточное отведение от гладкомышечных волокон репродуктивных органов для изучения синаптической передачи в симпатической нервной системе, медиатором которой в то время считался норадреналин. Отведение ими спонтанных миниатюрных потенциалов представляло важное открытие, поскольку до этого квантовое освобождение наблюдали лишь в нервно-мышечном соединении на скелетной мышце. Позже, однако, Бернсток и его коллеги[36] показали, что норадреналин является не единственным медиатором и что симпатические нейроны совместно с норадреналином высвобождают пурин (АТФ) и пептид (нейропептид Y). Миниатюрные потенциалы, обнаруженные в гладкой мышце, были в действительности вызваны не норадреналином, а АТФ, действующим прямо на рецепторы ионных каналов.

Существует два основных семейства пуринергических рецепторов, которые были идентифицированы, секвенированы и клонированы (глава 3). Семейство P1 включает восемь или более рецепторов, расположенных в пре- и постсинаптических структурах периферии и мозга. Они активируются преимущественно аденозином и сопряжены с G-белками. Хотя передатчиком, высвобождаемым из пресинаптических окончаний, является АТФ, он быстро разрушается ферментами до аденозина, который и является естественным агонистом для P1 рецепторов. Сам по себе, АТФ действует напрямую на рецепторы[37] семейства P2 в центральной и периферической нервной системе, где он регулирует эндокринную секрецию и сократимость гладкой мускулатуры.

Сенсорные входы вегетативной нервной системы

К приведенному описанию вегетативной нервной системы необходимо добавить два важных компонента: сенсорные входы и рефлекторную регуляцию. На самом деле, в учебниках по физиологии и фармакологии вегетативная нервная система часто рассматривается как чисто моторная система, управляющая гладкой мускулатурой, сердечной мышцей и железами. Одной из причин, по которым вегетативной регуляции не уделяется должного внимания, является недостаточность наших знаний. Механизмы сокращения гладкой мускулатуры, такие как сокращение и расслабление кровеносных сосудов, поступательное перемещение пищи по кишечнику и опорожнение мочевого пузыря, кажутся более простыми, чем, скажем, игра в теннис. В действительности, они требуют весьма сложной интеграции. Со стороны афферентных входов, от сенсорных рецепторов глаза, легких, кровеносных сосудов, внутренностей и других тканей-мишеней постоянно поступает информация о состоянии управляемых органов (рис. 16.6). В число этих рецепторов входят и ноцицепторы, способные передавать ощущение сильной боли.

Простым, на первый взгляд, и хорошо изученным рефлексом является ответ системы кровообращения на изменение положения тела. Когда тело человека находится в горизонтальном положении, мозг снабжается кровью в отсутствие различий кровяного давле-

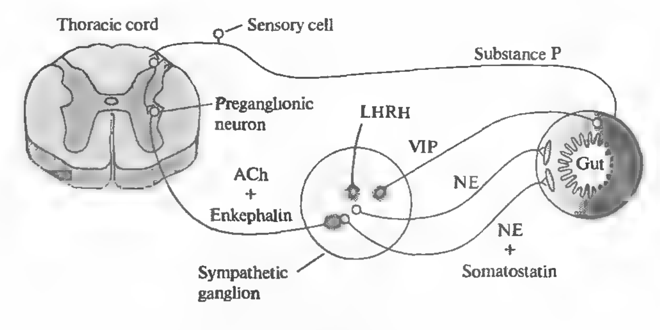


Рис. 16.6. Локализация медиаторов и нейропептидов в нейронах симпатической нервной системы.

Fig. 16.6. Localization of Transmitters and neuropeptides in neurons of the sympathetic nervous system. All known transmitters are found in the intestine. NE = norepinephrine. (After Hukfelt et al., 1980.)

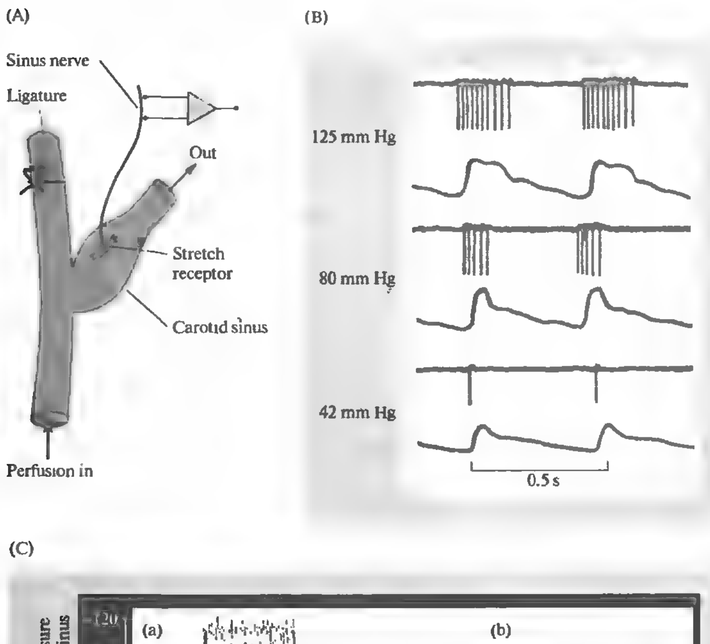
ния между ногами и головой. Переход в вертикальное положение приводит к снижению кровяного давления в участках тела, расположенных выше уровня сердца, и к одновременному накоплению крови в кишечнике и в ногах. При отсутствии автономной регуляции возможна потеря сознания в момент вставания, обусловленная снижением притока крови к мозгу. Рецепторы, которые сигнализируют о необходимости изменения паттерна циркуляции крови, расположены в крупной артерии шеи, называемой сонной артерией. Нервные окончания представляют собой рецепторы растяжения, встроенные в утолщение артериальной стенки, называемое каротидным синусом. Растяжение сосудистой стенки приводит к усилению импульсации, как показано на рис. 16.7.

Сенсорные аксоны направляются в ствол мозга и оканчиваются в строго определенных ядрах (ядра одиночного пучка, или солитарного тракта). Нейроны этих ядер, в свою очередь, проецируются в ретикулярную формацию ствола мозга, откуда осуществляется проекция на преганглионарные нейроны. В горизонтальном положении высокая частота сенсорной импульсации приводит к торможению кардиоваскулярных симпатических выходов (рис. 16.7). Когда человек лежит, его кровяное давление, частота сердечных сокращений и сердечный выброс снижены, а кровеносные сосуды кожи и кишечника расширены. При вставании давление в артерии падает, и частота импульсации в аксонах каротидного синуса резко снижается, снимая центральное торможение. В результате происходит увеличение симпатической активности, приводящее к сужению кровеносных сосудов в коже и кишечнике, а сердечный выброс и частота сердечных сокращений повышаются. Повышение давления поддерживает кровоснабжение мозга. Записи на кимографе (вращающемся закопченном барабане), сделанные несколько десятилетий назад Анрепом и Старлингом, хорошо иллюстрируют вышеизложенное[38]. (Это именно тот Старлинг, который вместе с Бейлисом в 1902 году впервые ввел термин «гормон» и предложил концепцию гормонального воздействия, контролирующего секрецию в кишечнике.)

Описание рефлекса, представленное на рис. 16.7, кажется простым. Однако центральные симпатические и парасимпатические интегративные механизмы перенаправления крови туда, где она срочно необходима, до сих пор неизвестны[39]. Вышесказанное справедливо и для других вегетативных рефлексов, сенсорные и моторные звенья которых известны, — например, энтеральных, эвакуаторных и респираторных рефлексов[40)—42)].

Энтеральная нервная система

Местные регуляторные рефлексы в кишечнике (рис. 16.6) в высшей степени сложны и обеспечиваются огромным числом нейронов. Энтеральная нервная система содержит более 10 миллионов нервных клеток, расположенных в стенке кишечника и выполняющих функции сенсорных нейронов, интернейронов и мотонейронов. Все известные медиаторы присутствуют в этой системе (а многие из них были впервые обнаружены в кишечнике). Анализ внутренних рефлекторных цепей существенно затруднен тем, что эти рефлексы очень сложны и включают множество связей[43]. Функциональный анализ представляет серьезную проблему даже в таких простых системах, как кишечник лангуста. Когда Сельверстон и коллеги[44] начинали изучение стоматогастрических ганглиев, состоящих всего из 30 нейронов, то казалось, что им удастся полностью в них разобраться. Однако несмотря на значительные успехи, достигнутые путем электрического отведения от идентифицированных нейронов, и даже на открытие некоторых основополагаю-



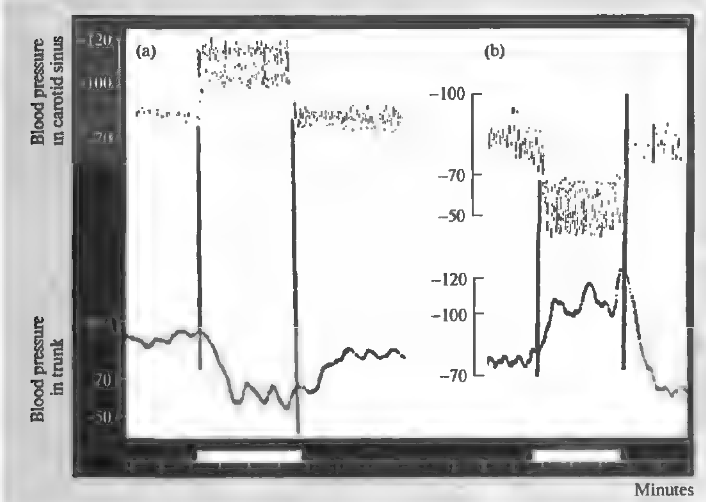
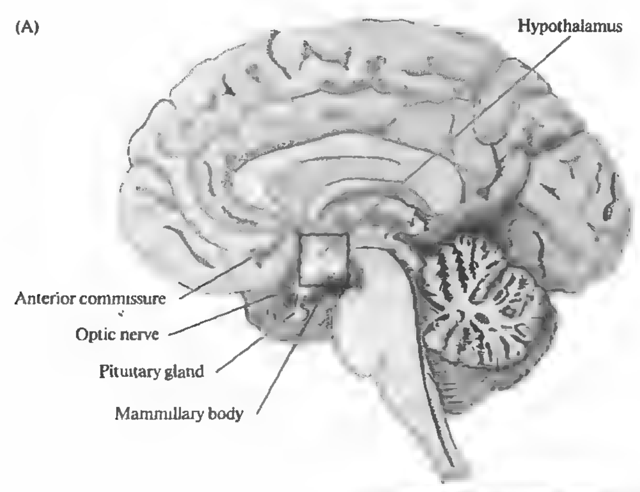


Рис. 16.7. Разряды рецепторов растяжения каротидного синуса в ответ на повышение кровяного давления. (А) Схема эксперимента для отведения активности чувствительных волокон каротидного синуса, растягиваемого при естественной циркуляции, или при перфузии. (В) Взаимоотношения между кровяным давлением и импульсацией в одиночном афферентном волокне. (С) Классическая запись системного кровяного давления (нижние кривые) и экспериментально изменяемого давления в сосудах изолированной головы, снабжаемой кровью другого животного (верхние кривые), сделанная в 1924 году с помощью ртутного манометра на закопченном барабане.

Fig. 16.7. Firing of Carotid Sinus Stretch Receptors in response to raised blood pressure. (A) Experimental arrangement for recording from sensory nerve fibers in the carotid sinus while it is distended by the circulation or, as in the diagram, artificially perfused. (B) Relationship between blood pressure (lower trace) and the firing of a single afferent fiber from the carotid sinus at different levels of mean arterial pressure (from top down: 125, 80, and 45 mm of mercury, measured with a manometer). (C) A classic record made in 1924. The head of this animal was supplied with blood from a different animal so that blood pressure in the head arteries could be controlled separately by the experimenters. (a) Increased pressure in the head caused a fall in systemic blood pressure in the trunk of the animal. (b) Decreased pressure in the head caused an increase in systemic pressure. Such records were made before electrical recordings were possible; experimenters determined blood pressure using a mercury manometer and registered the movements with a fine pointer on a smoked drum. (B redrawn from Neil, 1954; C after Starling, 1941.)

щих принципов нейробиологии, полного понимания по-прежнему нет. То, что казалось на первый взгляд простой системой регуляции работы кишечника, оказалось не жесткой и статичной, а пластичной и изменчивой структурой.



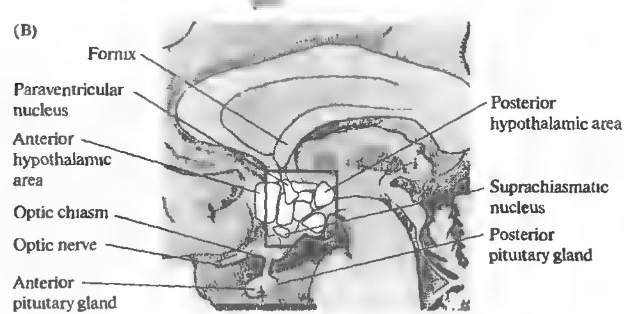


Рис. 16.8. Расположение гипоталамуса и гипофиза в мозге человека. (A) Продольное сечение мозга. (B) Ядра гипоталамуса и смежные структуры.

Fig. 16.8. Position of the Hypothalamus and the Pituitary Gland in the human brain. (A) Sagittal section of brain, with the area shown in B outlined. (B) Nuclei of the hypothalamus and adjacent structures.

Регуляция вегетативных функций в гипоталамусе

Существенная часть процессов управления в вегетативной нервной системе обеспечивается гормонами. Секреция гормонов железами (такими, как щитовидные, половые и кора надпочечников) регулируется релизинг-факторами, секретируемыми в ЦНС (обсуждается в следующих разделах). В свою очередь, гормоны оказывают обратное действие на ЦНС, регулируя секрецию релизинг-факторов, и замыкают, таким образом, петлю обратной связи.

Гипоталамус (рис. 16.8 и 16.9) — это отдел мозга, который регулирует интегративные вегетативные функции, включая температуру тела, аппетит, потребление воды, дефекацию, мочеиспускание, частоту сердечных сокращений, артериальное давление, половую деятельность, лактацию, а также, в более медленной временной шкале, рост тела[45)]. Точность гомеостатических механизмов обеспечивает возможность каждому из нас поддерживать температуру тела около 37° С, кровяное давление около 120/80 мм рт. ст., частоту сердечных сокращений 70 ударов в минуту, потребление и выделение воды на уровне 1,5 литров в день, постоянное продвижение пищи по пищеварительному тракту с соответствующей секрецией, необходимой для пищеварения и абсорбции на каждом из уровней. Гипоталамус — это также отдел мозга, в котором эмоции сопрягаются с вегетативными ответами: мысль о пище приводит к секреции слюны, ожидание физической нагрузки — к повышению симпатической активности и т. д.

Другой тонко регулируемой функцией гипоталамуса является генерация в высшей степени точных и регулярных ритмов. К числу медленных относятся ритмы, контролирующие эндокринную секрецию. Например, половая и репродуктивная функции осциллируют с недельной периодичностью, которая зависит от секреции клетками гипоталамуса пептидных гормонов. Последние, в свою очередь, действуют на железы передней доли гипофиза, вызывая выделение в кровоток других гормонов.

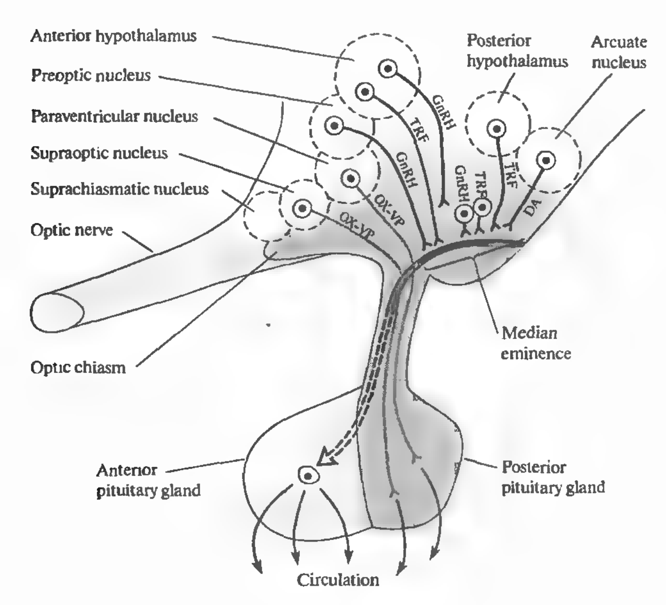


Рис. 16.9. Связи нейронов гипоталамуса с нейрогипофизом (задней долей гипофиза) и аденогипофизом (передней долей гипофиза). Аксоны направляются прямо в нейрогипофиз. Там их терминали секретируют гормоны в кровеносное русло. В противоположность этому, высвобождающие гормоны (релизинг-факторы), выделяемые нейронами в гипоталамусе, транспортируются в аденогипофиз в высоких концентрациях через специально предназначенные для этого «портальные» сосуды (показаны пунктиром). Там релизинг-факторы активируют секреторные клетки, которые выбрасывают свои гормоны в систему кровообращения.

Fig. 16.9. Connections of Hypothalamic Neurons with the neurohypophysis (posterior pituitary gland) and adenohypophysis (anterior pituitary gland). Axons run directly to the neurohypophysis. There the terminals secrete hormones into the circulation. By contrast, releasing hormones released by neurons in the hypothalamus reach the adenohypophysis in high concentration through a dedicated group of "portal" vessels (dashed lines). There they activate secretory cells, which liberate hormones into the circulation. DA = dopamine, GnRH = gonadotropin-releasing hormone, TRF = thyroid hormone-releasing factor, OX-VP = oxytocin-vasopressin.

Нейроны гипоталамуса, высвобождающие гормоны

Хорошо изученным примером гормональной секреции нейронов гипоталамуса является секреция релизинг-фактора гонадотропина (GnRH, то же что LHRH)[46]. Основной функцией этих нейронов является секреция GnRH в «портальную систему» кровеносных сосудов, напрямую соединяющих гипоталамус с передней долей гипофиза (рис. 16.9). Нейронально освобождаемый GnRH, таким образом, избирательно действует на железы, которые не имеют прямой иннервации, обеспечивая центральной нервной системе возможность контролировать гормональную секрецию. Выделившийся релизинг-фактор затем разбавляется в крупных сосудах кровеносной системы, в результате чего уже не может, к примеру, влиять на синаптическую передачу в вегетативных ганглиях. В передней доле гипофиза (аденогипофизе) GnRH возбуждает особые клетки, секретирующие гонадотропин, гормон, необходимый для обеспечения репродуктивных ритмов и функций.

Это краткое упрощенное изложение не отражает элегантных экспериментов Хэрриса, который впервые показал, что локальное выделение релизинг-факторов в гипоталамусе представляет собой важный регуляторный механизм[47, 48]. Его концепция доставки химических сигналов через систему кровеносных сосудов путем целенаправленного транспорта была поистине революционной.

Распределение и численность GnRH-секретирующих клеток

GnRH-секретирующие клетки рассредоточены по всему гипоталамусу и не образуют четко локализованных ядер или скоплений. Среди них выделяются лишь GnRH-секретирующие клетки, расположенные вблизи передней доли гипофиза (в срединном возвышении гипоталамуса), которые, как показано в предыдущем разделе, обеспечивают секрецию гонадотропина гипофизом (рис. 16.9). Высвобождение самих релизинг-факторов обеспечивается гормонами, такими как гормоны половых желез, образующими обратную связь с мозгом, и синаптическими входами, использующими различные медиаторы, включая норадреналин, дофамин, гистамин, глутамат и ГАМК[49, 50].

Характерной особенностью GnRH-секретирующих клеток является их небольшая численность: 1 300 у крысы и 800 у мыши[51]. Однако крысы и мыши (да и люди тоже) просто вымерли бы без этих немногочисленных и разрозненных клеток мозга. Второе замечательное свойство этих клеток связано с их онтогенетическим развитием (глава 23). У эмбрионов крыс с 10 по 15 дни развития клетки-предшественники впервые появляются в участке обонятельной плакоды. Это регион, из которого впоследствии развивается обонятельный эпителий. После деления, клетки мигрируют вдоль аксонов обонятельного нерва и достигают гипоталамуса[51, 52]. Проводящие пути и молекулярные механизмы миграции GnRH-секретирующих клеток были изучены на эмбрионах, новорожденных опоссумах и в культурах клеток[53]. Поскольку все эти клетки могут быть надежно помечены антителами, специфичными к GnRH, их можно количественно учитывать как в месте их происхождения, так и по ходу миграции. Нейроны других типов тоже мигрируют вдоль тех же аксональных путей, что и GnRH-секретирующие клетки. Однако, не достигнув гипоталамуса, они отклоняются в сторону, попадая в совершенно другие области мозга[54].

На рис. 16.9 показано, что наряду с GnRH-секретирующими клетками в гипоталамусе существуют особые популяции нейронов, секретирующих другие гормоны, необходимые для обеспечения вегетативных функций. Обмен веществ, функция щитовидной железы, абсорбция солей в почках, а также рост зависят от рилизинг-факторов, которые секретируются в портальную систему и воздействуют через нее на переднюю долю гипофиза.

Особые нейроны гипоталамуса, расположенные в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах (рис. 16.9) напрямую иннервируют заднюю долю гипофиза. Их окончания высвобождают в кровь антидиуретический гормон (ADH), называемый также вазопрессином, и окситоцин[55)–57]. Следовательно, регуляция абсорбции воды почками и сокращений матки напрямую зависит от импульсной активности нейронов гипоталамуса.

Циркадные ритмы

Особо важную роль в жизнедеятельности животных имеют циркадные ритмы, контролирующие суточный цикл и цикл сон-бодрствование. В отсутствие каких-либо внешних сигналов, 24-часовые ритмические ци-

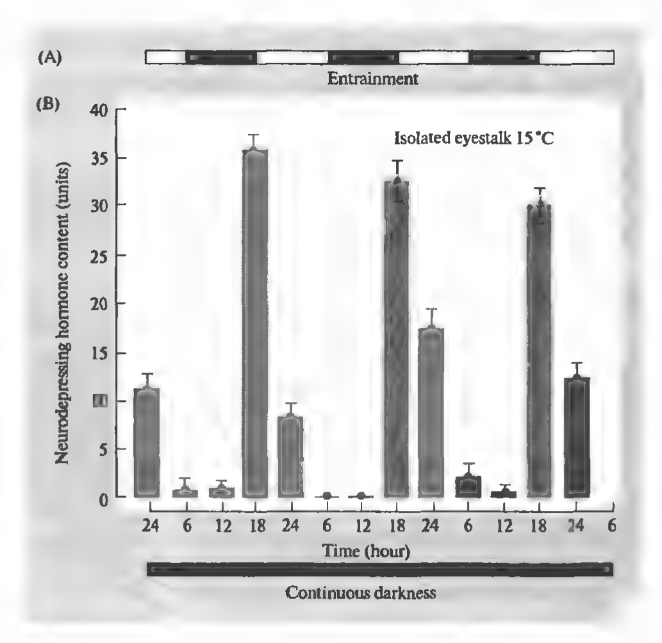


Рис. 16.10. Циркадный ритм изолированного глазного стебелька речного рака. (A) Изолированный глазной стебелек, поддерживаемый в органотипической культуре, перед началом эксперимента был настроен на цикл чередования света и темноты (показано вверху чередующимися светлыми и темными полосами). (B) Измерение содержания гормона в условиях, когда препарат был лишен поступления каких-либо стимулов и содержался в темноте (черная полоса внизу). Навязанный ранее суточный ритм при этом сохраняется.

Fig. 16.10. Circadian Rhythm of Crayfish Eyestalks in Isolation. (A) The isolated eye-stalk was kept in organ culture and entrained to light–dark cycles (indicated by the alternating light and dark bars above). (B) Later, at the time of the experiment when the hormone content was measured, the eyestalk was deprived of all stimuli and kept in darkness (indicated by the black bar below). The day–night rhythm clearly persisted. (After Arechiga et al., 1993.)

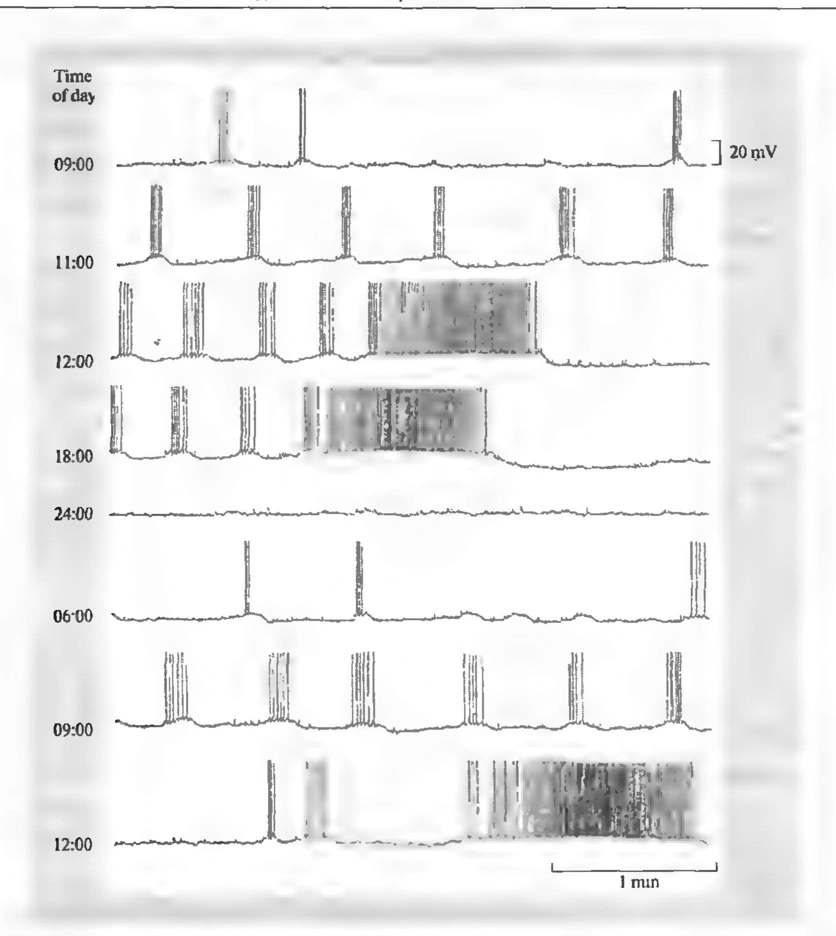


Рис. 16.11. Циркадные разряды нейронов органотипической культуры глазного стебелька речного рака. В течение 24-часового цикла внутриклеточно регистрируемая импульсная активность одиночного нейрона претерпевает циклические изменения.

Fig. 16.11. Circadian Firing of Neurons of crayfish eyestalk maintained in culture. During the 24-hour cycle the action potential activity recorded intracellularly from a single neuron undergoes cyclical changes. Regular bursts occur at 10:00 a. m., followed by irregular firing between 12:00 noon and 6:00 p. m., and silence at midnight; next morning the regular bursts begin again. (From records kindly provided by H. Arechiga and U. Garcia.)

клы поддерживаются внутренними часами в течение продолжительного времени (недели и месяцы) как у беспозвоночных, так и у позвоночных[58)–60)], и даже в эксплантатах и культурах нейронов[61)–63)]. Внутренний механизм синхронизации может быть изменен (или «навязан») воздействием регулярно чередующихся световых и темновых стимулов[64)]. Вегетативные функции находятся под сильным влиянием биологических часов, которые действуют на шишковидную железу и секрецию мелатонина[65, 66)].

Сведения о клеточных и молекулярных механизмах, позволяющих нейронам обеспечивать регулярные суточные циклы, были получены как на беспозвоночных, так и на позвоночных. Например, в зрительных путях ракообразных существует скопление секреторных нервных клеток, называемое глазным стебельком (eyestalk). В этой структуре можно поддерживать ритмы метаболической активности, секреции и импульсных разрядов, даже если изолированный орган поддерживается в культуре[67)]. На такой органотипической культуре было проведено отведение элек-

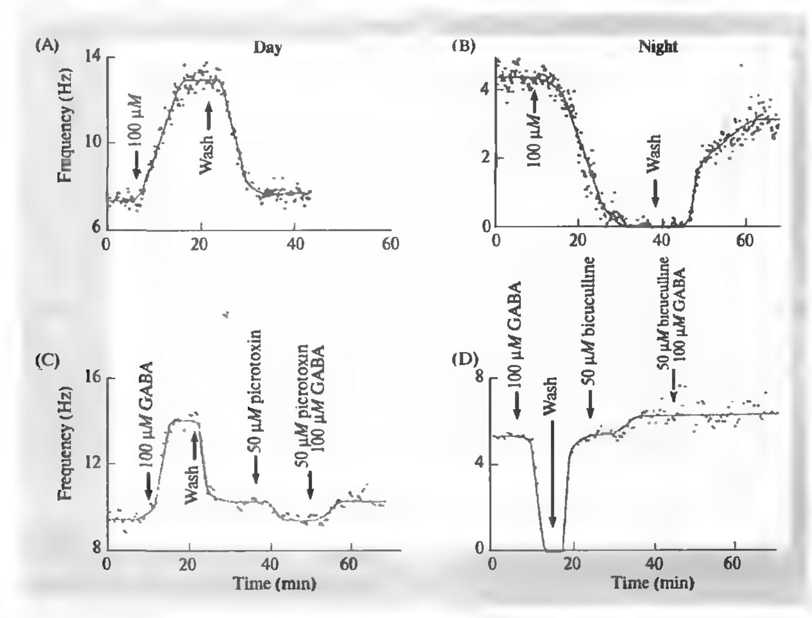


Рис. 16.12. Циркадный ритм среза супрахиазматического ядра крысы, поддерживаемого в культуре. ГАМК, аппплицированная в разное время суток в процессе внеклеточного отведения нейронной активности, вызывала увеличение частоты импульсации в дневное время (A) и ее снижение ночью (B). Отведения на C и D показывают, что эффекты, вызываемые ГАМК, блокируются антагонистами ГАМК (бикукуллином и пикротоксином).

Fig. 16.12. Circadian Rhythm of Slice of Rat Suprachiasmatic Nucleus maintained in culture. GABA was applied at different times while extracellular recordings were made from neurons. GABA gave rise to increases of action potential frequency in the daytime (A) and decreases at night (B). The recordings in C and D show that the effects of GABA were blocked by GABA antagonists (bicuculline and picrotoxin). The change from excitation to inhibition can be accounted for in terms of changed intracellular chloride concentrations, which were assessed by whole-cell patch recordings (not shown). The conductance change produced by GABA remains unchanged during the day–night cycle. The mechanisms that rhythmically change intracellular chloride concentration are not yet known. (After Wagner et al., 1997.)

трической активности пейсмекерных клеток, охарактеризованы пептиды, выделяемые этими клетками, и проанализированы механизмы их действия. Более того, было показано, что ритм активности пейсмекерных нейронов в культуре может быть изменен путем навязывания чередующихся световых и темновых периодов. Примеры циркадных ритмов, генерируемых клетками в культуре, показаны на рис. 16.10 и 16.11.

У теплокровных ключевой структурой в гипоталамусе для генерации ритма внутренних часов является супрахиазматическое ядро (SCN). Важным входом этого ядра является проекция глаза[68]. После разрушения супрахиазматического ядра у крыс теряется способность настраивать эндогенный ритм на частоту чередования световых и темновых периодов. Двигательная активность, потребление воды, циклы сна-бодрствования и гормональной секреции нарушаются[69, 70]. Если трансплантировать эмбриональные ткани гипоталамуса, содержащие SCN, хозяину, ритмическая активность которого была предварительно нарушена путем полного удаления SCN, то ритм его деятельности восстанавливается с новым периодом, соответствующим генотипу донора.

В нейронах супрахиазматического ядра частота спонтанных потенциалов действия увеличивается в течение дня и снижается ночью, как показано на рис. 16.12. За счет какого механизма устанавливается этот ритм? Этот вопрос был исследован на срезах SCN, поддерживаемых в культуре (органотипические срезы)[71]. Показано, что основным медиатором, используемым нейронами этого ядра, является ГАМК[72]. Ером и коллеги[69] показали, что нейроны SCN в срезах отвечают на ГАМК деполяризацией и повышением частоты разрядов в течение дня (рис. 16.12A). Та же концентрация ГАМК, апплицированная

ночью, вызывает гиперполяризацию и снижение частоты разрядов (рис. 16.12B). Следовательно, как и в развивающейся ЦНС[73)], ГАМК может быть как возбуждающим, так и тормозным медиатором. Тип ответа зависит от уровня внутриклеточной концентрации хлора. Как описано в главе 5, если концентрация хлора внутри клетки низка, то хлорный потенциал равновесия (E_{Cl}) более отрицателен, чем потенциал покоя. Открывание ГАМК-чувствительных каналов позволяет ионам хлора входить в клетку и гиперполяризовать мембрану. С увеличением внутриклеточной концентрации хлора, E_{Cl} сдвигается в сторону более положительных, по сравнению с потенциалом покоя, значений. В результате ГАМК вызывает движение ионов хлора из клетки наружу и увеличивает деполяризацию (см. также Gribkoff et al. как альтернативную схему генерации ритма)[74)]. Неизвестно, является ли изменение внутриклеточной концентрации хлора единственным механизмом, ответственным за генерацию ритма в нейронах SCN, и каков механизм, ответственный за изменения этой концентрации.

С помощью генетических методов были выявлены общие белки, которые в царстве животных связаны с периодичностью. Гены и белки, контролирующие циркадные ритмы, идентифицированы и клонированы у дрозофилы[75)]. У многих видов два таких белка, известные как *per* (period, период) и *frq* (frequency, частота), были обнаружены в пейсмекерных областях, таких как супрахиазматическое ядро. У мух выключение гена *per* приводит к исчезновению циркадного ритма. Последующее включение этого гена восстанавливает ритм[76, 77)]. Хотя пока не выявлено прямых связей между регуляторными белками и уровнем внутриклеточного хлора, важно то, что теперь мы можем пытаться объяснить циркадные ритмы с точки зрения генов и ионных концентраций на хорошо установленных группах нейронов.

Выводы

- Вегетативная нервная система регулирует важнейшие функции всех внутренних органов и, в свою очередь, регулируется с помощью гормональных и сенсорных обратных связей.
- Парасимпатические эффекты более сфокусированы по сравнению с диффузными эффектами симпатической активации.
- АХ является основным медиатором, используемым для передачи в вегетативных ганглиях, в парасимпатических нервных окончаниях и в некоторых симпатических нервных окончаниях.
- Норадреналин является основным медиатором для большинства симпатических окончаний. К числу других медиаторов относится ацетилхолин, пептиды и АТФ.
- Одна и та же молекула (например, LHRH, называемая также GnRH) может действовать и как медиатор в синапсах, и как гормон в мозге.
- Анализ эффектов, вызываемых вегетативной нервной системой, сложен ввиду разнообразия рецепторов и большого числа пептидов и непептидных медиаторов.
- Адреналин выделяется в качестве гормона из мозгового слоя надпочечников в кровеносную систему, достигая рецепторов в клетках-мишенях, на которые не действует выделяемый из нервных окончаний медиатор.
- Гипоталамус является областью мозга, управляющей общей активностью вегетативной нервной системы, а также регулирующей секрецию гормонов.
- Гипоталамус, в свою очередь, подвержен влиянию высших центров ЦНС и гормонов.

Рекомендуемая литература

Обзоры

◇ Arechiga, H. 1993. Circadian rhythms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 1005–1010.
◇ Brown, D. 1988. M-currents: An update. *Trends Neurosci.* 11: 294–299.
◇ Burnstock, G. 1993. Physiological and pathological roles of purines: An update. *Drug Dev. Res.* 28: 195–206.
◇ Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. 1996. *The Biochemical Basis of Pharmacology.* Oxford University Press, New York.

- Hall, J. C. 1995. Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.* 18: 230–240.
- Janig, W., and McLachlan, E. M. 1992. Characteristics of function-specific pathways in the sympathetic nervous system. *Trends Neurosci.* 15: 475–481.
- Marrion, N. V. 1997. Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 483–504.
- Moore, R. Y. 1997. Circadian rhythms: Basic neurobiology and clinical applications. *Annu. Rev. Med.* 48: 253–266.
- Rang, H. P., Dale, M. M., and Ritter, J. M. 1999. *Pharmacology*, 4th Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland, Chapters 6–10.
- Tosini, G., and Menaker, M. 1996. Circadian-rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272: 419–421.

Статьи

- Ewer, J., Rosbash, M., and Hall, J. C. 1998. An inducible promoter fused to the period gene in Drosophila conditionally rescues adult per-mutant arrhythmicity. *Nature* 333: 82–84.
- Holman, M. E., Coleman, H. A., Tonta, M. A., and Parkington, H. C. 1994. Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea pigs. *J. Physiol.* 478: 115–124.
- Kaufman, C. M., and Menaker, M. J. 1993. Effect of transplanting suprachiasmatic nuclei from donors of different ages into completely SCN lesioned hamsters. *Neural Transplant Plast.* 4: 257–265.
- Kuffler, S. W. 1980. Slow synaptic responses in autonomic ganglia and the pursuit of a peptidergic transmitter. *J. Exp. Biol.* 89: 257–286.
- Ralph, M. R., Foster, R., Davis, F. C., and Menaker, M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975–978.
- Selyanko, A. A., and Brown, D. A. 1996. Intracellular calcium directly inhibits potassium M channels in excised membrane patches from rat sympathetic neurons. *Neuron* 16: 151–162.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M., and Stühmer, W. 1997. Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J. Membr. Biol.* 160: 91–100.
- Ullian, E. M., McIntosh, J. M., and Sargent, P. B. 1997. Rapid synaptic transmission in the avian ciliary ganglion is mediated by two distinct classes of nicotinic receptors. *J. Neurosci.* 17: 7210–7219.
- Wagner, S., Castel, M., Gainer, H., and Yarom, Y. 1997. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387: 598–603.
- Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Dixon, J. E., and McKinnon, D. 1998. KCNQ2 and KCNW potassium channel subunits: Molecular correlates of the M-channel. *Science* 282: 1890–1893.
- Wray, S., Grant, P., and Gainer, H. 1989. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8132–8136.

Цитированная литература

1. Gabella, G. 1976. *The Structure of the Autonomic Nervous System.* Chapman and Hall, London.
2. Appenzeller, O. 1990. *The Autonomic Nervous System: An Introduction to Basic and Clinical Concepts.* Elsevier, New York.
3. Broadley, K. J. 1996. *Autonomic Pharmacology.* Taylor & Francis, London.
4. *J. Auton. Nerv. Syst.*
5. *J. Auton. Pharmacol.*
6. deGroat, W. C., et al. 1996. *Prog. Brain Res.* 107: 97–111.
7. Janig, W., and McLachlan, E. M. 1987. *Physiol. Rev.* 67: 1332–1404.
8. Gamlin, P. D., et al. 1998. *Vision Res.* 38: 3353–3358.
9. Taraskevich, P. S., and Douglas, W. W. 1984. *Fed. Proc.* 43: 2373–2378.
10. Refinetti, R., and Menaker, M. 1992. *Physiol. Behav.* 51: 613–637.
11. Inui, A. 1999. *Trends Neurosci.* 22: 62–67.
12. Douglas, W. W. 1966. *Pharmacol. Rev.* 18: 471–480.
13. McLachlan, E. M. (ed.). 1995. *Autonomic Ganglia.* Gordon and Breach, London.
14. Ullian, E. M., McIntosh, J. M., and Sargent, P. B. 1997. *J. Neurosci.* 17: 7210–7219.
15. Sargent, P. B. 1993. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 403–443.
16. Kuffler, S. W. 1980. *J. Exp. Biol.* 89: 257–286.
17. Jan, Y. N., Jan, L. Y., and Kuffler, S. W. 1980. *Proc. Natl. Acad. Scl. USA* 77: 5008–5012.
18. Holman, M. E., et al. 1994. *J. Physiol.* 478: 115–124.
19. Prud'homme, M. J., et al. 1999. *Brain Res.* 821: 141–149.
20. Kiyama, H., et al. 1993. *Brain Res. Mol. Broin Res.* 19: 345–348.

21. Adams, P. R., and Brown, D. A. 1980. *Br. J. Pharmacol.* 68: 353–355.
22. Adams, P. R., Brown, D. A., and Constanti, A. 1982. *J. Physiol.* 332: 223–262.
23. Brown, D. 1988. *Trends Neurosci.* 11: 294–299.
24. Jones, S. W., and Adams, P. R. 1987. In *Neuromodulation: The Biochemical Control of Neuronal Excitability.* Oxford University Press, New York, pp. 159–186.
25. Marrion, N. V. 1997. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 483–504.
26. Wang, H. S., et al. 1998. *Science* 282: 1890–1893.
27. Selyanko, A. A., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 7742–7756.
28. Selyanko, A. A., and Brown, D. A. 1996. *Neuron* 16: 151–162.
29. Janig, W., and McLachlan, E. M. 1992. *Trends Neurosci.* 15: 475–481.
30. Ekstrom, J., Asztely, A., and Tobin, G. 1998. *Eur. J. Morphol.* 36 Suppl.: 208–212.
31. Zhang, Z., Evans, R. L., and Culp, D. J. 1998. *Eur. J. Morphol.* 36 Suppl.: 219–221.
32. Burnstock, G. 1993. *Drug Dev. Res.* 28: 195–206.
33. Guidry, G., and Landis, S. C. 1998. *Dev. Biol.* 199: 175–184.
34. Burnstock, G. 1995. *J. Physiol. Pharmacol.* 46: 365–384.
35. Burnstock, G., and Holman, M. E. 1961. *J. Physiol.* 155: 115–133.
36. Kasakov, L., et al. 1988. *J. Auton. Nerv. Syst.* 22: 75–82.
37. Soto, F., Garcia-Guzman, M., and Stühmer, W. 1997. *J. Membr. Biol.* 160: 91–100.
38. Starling, E. H. 1941. *Starling's Principles of Human Physiology.* Churchill, London.
39. Sato, T., et al. 1999. *Am. J. Physiol.* 276: H2251–H2261.
40. Raybould, H. E., et al. 1991. *Adv. Exp. Med. Biol.* 298: 109–127.
41. Morgan, C., deGroat, W. C., and Nadelhaft, I. 1986. *J. Comp. Neurol.* 243: 23–40.
42. Coleridge, H. M., and Coleridge, J. C. 1994. *Respir. Physiol.* 98: 1–13.
43. Obaid, A. L., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 3073–3093.
44. Selverston, A., et al. 1998. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 860: 35–50.
45. Brooks, C. M. 1988. *Brain Res. Bull.* 20: 657–667.
46. Dellovade, T., et al. 1998. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 276–282.
47. Harris, G. W., and Naftolin, F. 1970. *Br. Med. Bull.* 26: 3–9.
48. Harris, G. W., and Ruf, K. B. 1970. *J. Physiol.* 208: 243–250.
49. Rissman, E. F. 1996. *Biol. Reprod.* 54: 413–419.
50. Segovia, C. T., et al. 1996. *Life Sci.* 58: 1453–1459.
51. Wray, S., Grant, P., and Gainer, H. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8132–8136.
52. Tarozzo, G., et al. 1998. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 839: 196–200.
53. Fueshko, S., and Wray, S. 1994. *Dev. Biol.* 166: 331–348.
54. Tarozzo, G., et al. 1995. *Proc. R. Soc. Lond. B* 262: 95–101.
55. Cunningham, E. T., Jr., and Sawchenko, P. E. 1991. *Trends Neurosci.* 14: 406–411.
56. Gainer, H., et al. 1986. *Neuroendocrinology* 43: 557–563.
57. Obaid, A. L., and Salzberg, B. M. 1996. *J. Gen. Physiol.* 107: 353–368.
58. Pohl, C. R., and Knobil, E. 1982. *Annu. Rev. Physiol.* 44: 583–593.
59. Moore, R. Y. 1997. *Annu. Rev. Med.* 48: 253–266.
60. Arechiga, H. 1993. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 1005–1010.
61. Tosini, G., and Menaker, M. 1996. *Science* 272: 419–421.
62. Martinez de la Escalera, G., Choi, A. L. H., and Weiner, R. L. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1852–1855.
63. Herzog, E. D., Takahashi, J. S., and Block, G. I. D. 1998. *Nature Neurosci.* 1: 708–713.
64. Boivin, D. B., et al. 1996. *Nature* 379: 540–542.
65. Borjigin, J., Li, X., and Snyder, S. H. 1999. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 53–65.
66. Cassone, V. M. 1998. *Chronobiol. Int.* 15: 457–473.
67. Arechiga, H., et al. 1993. *Chronobiol. Int.* 10: 1–19.
68. Kornhauser, J. M., Mayo, K. E., and Takahashi, J. S. 1996. *Behav. Genet.* 26: 221–240.
69. Ralph, M. R., et al. 1990. *Science* 247: 975–978.
70. Kaufman, C. M., and Menaker, M. J. 1993. *Neural Transplant Plast.* 4: 257–265.
71. Wagner, S., et al. 1997. *Nature* 387: 598–603.
72. Strecker, G. J., Wuarin, J. P., and Dudek, F. E. 1997. *J. Neurophysiol.* 78: 2217–2220.
73. Cherubini, E., Gaiarsa, J. L., and Ben-Ari, Y. 1991. *Trends Neurosci.* 14: 515–519.
74. Gribkoff, V. K., et al. 1999. *J. Biol. Rhythms* 14: 126–130.
75. Hall, J. C. 1995. *Trends Neurosci.* 18: 230–240.
76. Zehring, W. A., et al. 1984. *Cell* 39: 369–376.
77. Ewer, J., Rosbash, M., and Hall, J. C. 1998. *Nature* 333: 82–84.

Глава 17

Трансдукция механических и химических стимулов

Интенсивность и временные параметры стимулов кодируются в виде рецепторных потенциалов, возникающих в чувствительных окончаниях сенсорных клеток. Рецепторные потенциалы могут быть деполяризационными или гиперполяризационными; они возрастают по амплитуде с увеличением интенсивности раздражителя и достигают состояния насыщения при более высоких уровнях стимула. Во время длительного раздражения рецепторные потенциалы адаптируются, что проявляется в снижении их амплитуды. Адаптация может происходить как быстро, так и медленно. Она обусловлена механическими, электрическими или биохимическими процессами, происходящими в различных типах клеток. Рецепторы, которые адаптируются медленно, кодируют длительность стимула. Быстро адаптирующиеся рецепторы специализируются на выявлении изменений параметров раздражителя.

Трансдукция механических стимулов происходит в самых разнообразных сенсорных клетках, расположенных в коже, мышцах, связках и внутренних органах. Чувствительные волосковые клетки внутреннего уха являются примером механизма, за счет которого деформация преобразуется в электрические сигналы. Так, движение головы или звук, достигающий уха, отклоняет пучки волосков и вызывает открывание неселективных катионных каналов, что приводит к деполяризации. Во время продолжительного отклонения волосков каналы вновь закрываются в результате процессов адаптации, зависящих от кальция.

Обонятельные рецепторы состоят из реснитчатых рецепторных клеток, расположенных в носовой полости; их механизм трансдукции существенно отличается от механизма механотрансдукции. Обонятельные раздражители воздействуют на рецепторы, относящиеся к большому семейству рецепторов, сопряженных с G-белками. Возникающее в результате этого повышение концентрации циклического аденозин-монофосфата (цАМФ) приводит к открыванию катионных каналов, а вызванная этим деполяризация, в свою очередь, генерирует потенциалы действия. Сходным образом, во вкусовых бугорках определенные вкусовые раздражители (аминокислоты, сахара и соединения с горьким вкусом) преобразуются мембранными рецепторами, связанными с G-белками. Как и в предыдущем случае, увеличение цАМФ вызывает открывание катионных каналов, и возникают потенциалы действия. Соли и кислоты (вещества с кислым вкусом) могут воздействовать непосредственно на ионные каналы в рецепторной клетке вкусового бугорка. Трансдукция в рецепторах, специфичных для восприятия болевых и температурных ощущений, включает как прямое воздействие на катионные каналы в чувствительных нервных окончаниях, так и активацию метаботропных рецепторов. В дополнение к этому, клетки в поврежденных тканях высвобождают вещества, сенситизирующие нервные волокна, проводящие болевую импульсацию.

Мы познаем физический мир благодаря нашим органам чувств. Мы протягиваем руку, чтобы коснуться ближайших объектов, либо воспринимаем сигналы, передаваемые на расстоянии. Сенсорные рецепторы — это ворота, через которые проходят эти сигналы. Уже в исходной точке рецепторы задают основу того сенсорного анализа, который впоследствии осуществляется центральной нервной системой. Они определяют пределы чувствительности и устанавливают диапазон сигналов, которые могут быть выявлены и на которые последует реакция. За редким исключением, каждый тип рецептора специализирован, чтобы избирательно реагировать лишь на энергию одного типа раздражителя, называемого **адекватным стимулом**. Палочки и колбочки сетчатки глаза реагируют на свет (глава 19), нервные окончания кожи — на прикосновение, давление или вибрацию, рецепторы языка — на химические вкусовые раздражители.

Стимул, какой бы модальности он ни был, всегда конвертируется (или **трансдуцируется**) в электрический сигнал, в **рецепторный потенциал**. В общем, сила и длительность любого раздражителя кодируются электрическими сигналами; распознавание центральной нервной системой модальности раздражителя и его местонахождения зависит от природы сенсорного окончания и его анатомического расположения. Таким образом, температурный рецептор, расположенный в ступне ноги, имеет свой собственный проводящий путь в нервную систему, совершенно иной, чем путь от вибрационного рецептора кисти руки, но в обоих аксонах сигналами являются пачки потенциалов действия различной частоты и длительности.

Для сенсорных сигналов характерна большая степень усиления на рецепторном уровне, так что даже очень небольшой внешний раздражитель способен запустить высвобождение накопленных на мембране зарядов, которые преобразуются в электрические потенциалы. Например, запахи, издаваемые всего лишь несколькими молекулами специфических пахучих веществ (феромонов) способны воздействовать на мотыльков как сексуальный аттрактант. Сходным образом, всего нескольких квантов света, уловленных рецепторами сетчатки, достаточно, чтобы вызвать зрительное ощущение. Такой же, близкой к пределу возможного, чувствительностью обладает и внутреннее ухо, способное различить механические смешения величиной всего 10^{-10} м[1]. Столь же замечательными свойствами обладают электрические рецепторы некоторых рыб, способные улавливать электрические поля в несколько нановольт на сантиметр[2, 3]. По мощности это меньше, чем поле, которое бы возникло, если два провода, подключенных к полюсам обычной батарейки для фотовспышки, погрузить в Атлантический океан, один в районе Бордо, а другой возле Нью-Йорка!

Сенсорные рецепторы имеют вполне определенный спектр стимулов, на которые они реагируют. Например, наши слуховые волосковые клетки могут реагировать на звук только в пределах полосы частот примерно от 20 до 20 000 Гц. Реакция рецепторов нашей сетчатки на электромагнитное излучение сходным образом ограничена диапазоном длин волн примерно от 400 до 750 нанометров. Более коротковолновое (ультрафиолетовый свет) и более длинноволновое (инфракрасный свет) излучение глазом не воспринимается. Ограничения такого рода обычно не обусловлены неизбежными физическими пределами. Скорее, каждая система настроена на конкретную потребность организма: киты и летучие мыши могут слышать более высокие частоты; змеи могут воспринимать инфракрасное, а пчелы — ультрафиолетовое излучение. У собак и свиней чувство обоняния более утонченное, чем у людей.

Какие механизмы обеспечивают столь высокую чувствительность и избирательность рецепторных клеток сенсорных органов? В данной главе мы сосредоточимся на особенностях трансдукции механических и химических сенсорных стимулов. Чтобы описать **механотрансдукцию**, мы выбрали мышечные рецепторы растяжения и механорецептивные волосковые клетки внутреннего уха. Механизмы **хемотрансдукции** иллюстрируются обонятельными и вкусовыми рецепторами. Мы завершаем главу обсуждением **ноцицепции**, которая лежит в основе восприятия боли и сочетает в себе трансдукцию химических и механических стимулов. (Фототрансдукция в палочках и колбочках сетчатки описана отдельно в главе 19.)

§ 1. Кодирование стимулов механорецепторами

Короткие и длинные рецепторы

Рецепторный потенциал, генерируемый в процессе трансдукции стимула, отражает интенсивность и длительность исходного раздражителя. В некоторых рецепторах, таких как палочки и колбочки в сетчатке, которые не имеют длинных аксонов, рецепторные потенциалы распространяются пассивно, от чувствительной зоны клетки к ее синаптической зоне (рис. 17.1А). Такие рецепторы известны как **короткие рецепторы**. Переход информации от рецепторного конца к синаптическому концу клетки не требует участия потенциалов действия. В некоторых клетках пассивное распространение рецепторного потенциала может достигать удивительно отдаленных точек. Например, в механорецепторах некоторых ракообразных[4] и пиявок[5] и в фоторецепторах глаза морской уточки (barnacle)[6] рецепторный потенциал распространяется пассивно на расстояние нескольких миллиметров. В таких клетках сопротивление мембра-

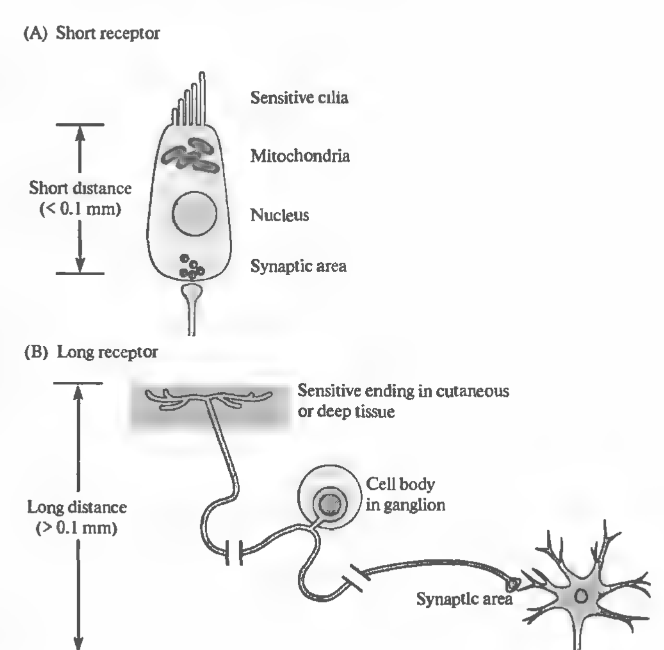


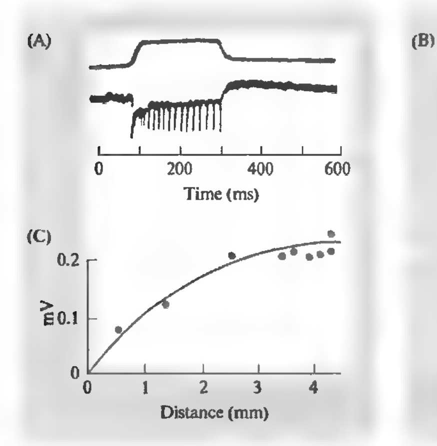
Рис. 17.1. Короткие и длинные сенсорные рецепторные клетки. (А) Короткие рецепторы сетчатки, такие как палочки и колбочки, а также механочувствительные волосковые клетки имеют длину не более 100 мкм. (В) Длинные рецепторы, такие как афференты мышечных веретен и кожные механорецепторы, используют потенциалы действия для передачи своих сигналов на удаленный вторичный нейрон.

Fig. 17.1. Short and Long Sensory Receptor Cells. (A) Short receptors—such as retinal rods and cones, and mechanosensory hair cells of the inner ear—are less than 100 μm in length. Thus, receptor potentials generated within the sensitive ending spread effectively throughout the cell, altering transmitter release at synaptic areas. (B) Long receptors, such as muscle spindle afferents and cutaneous mechanoreceptors, employ action potentials to conduct their signals to a distant second-order neuron. The amplitude of the receptor potential is encoded in the frequency of action potentials it generates.

ны, а следовательно, и константа длины распространения пассивной деполяризации, необычайно высоки. Хотя рецепторные потенциалы обычно являются деполяризационными, некоторые короткие рецепторы реагируют на свои адекватные раздражители гиперполяризационным изменением потенциала. Это происходит, к примеру, в фоторецепторах сетчатки позвоночных (глава 19) и в кохлеарных волосковых клетках, в которых возникают как гиперполяризационные, так и деполяризационные ответы. Независимо от того, какова полярность рецепторного потенциала, короткие рецепторы тонически высвобождают нейромедиатор из своих синаптических зон; при этом деполяризация усиливает, а гиперполяризация снижает исходный уровень высвобождения.

В длинных рецепторах (рис. 17.1B), таких как рецепторы кожи или мышц, информация от одиночного рецептора может посылаться на гораздо большие расстояния, чтобы достичь сенсорных клеток второго порядка (например, от большого пальца ноги к спинному мозгу). Чтобы обеспечить это, рецептор совершает второе преобразование: рецепторный потенциал дает начало последовательности потенциалов действия, длительность и частота которой кодируют информацию о длительности и интенсивности исходного стимула. Затем этот импульсный разряд переносит данную информацию к синаптическим окончаниям клетки.

Частотное кодирование интенсивности стимула обеспечивается путем взаимодействия между стационарным рецепторным током от сенсорных окончаний и сдвигами проводимости во время потенциала действия. Повышение калиевой проводимости, происходящее во время фазы восстановления в конце каждого потенциала действия, гиперполяризует мембрану, смещая мембранный потенциал в направлении E_K (калиевого равновесного потенциала). Это увеличение калиевой проводимости, однако, весьма кратковременно, в результате чего поддерживаемый за счет постоянного растяжения трансдукционный ток вновь деполяризует мембрану до уровня генерации импульса. Чем сильнее рецепторный ток, тем скорее вновь достигается пороговый уровень генерации разряда и тем выше становится частота импульсации. Подобный анализ применим также ко всем нейронам, в которых любой синаптический вход, по аналогии



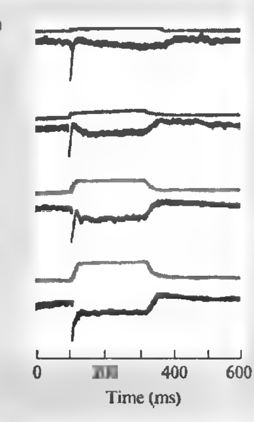


Рис. 17.2. Внеклеточно регистрируемые рецепторные потенциалы от чувствительных нервных волокон мышечного веретена. (А) Растяжение мышцы (верхняя кривая) вызывает рецепторный потенциал, сопровождающийся серией потенциалов действия (нижняя кривая). (В) Четыре уровня растяжения мышцы после добавления прокаина, блокирующего потенциалы действия (кроме первого). (С) Зависимость между амплитудой рецепторного потенциала и увеличением длины мышцы.

Fig. 17.2. Receptor Potentials Recorded Extracellularly from a sensory nerve fiber supplying a muscle spindle. The recording electrode is placed as close as possible to the receptor. Downward deflection of the voltage record (lower traces) indicates receptor depolarization. (A) Stretching the muscle (upper trace) produces a receptor potential, upon which is superimposed a series of action potentials (lower trace). (B) Four stretches of increasing magnitude applied to the muscle after procaine has been added to the bathing solution. Action potentials (except for the first) are abolished by procaine, but the receptor potentials remain. (C) Plot of receptor potential amplitude against increase in muscle length. (After Katz, 1950.)

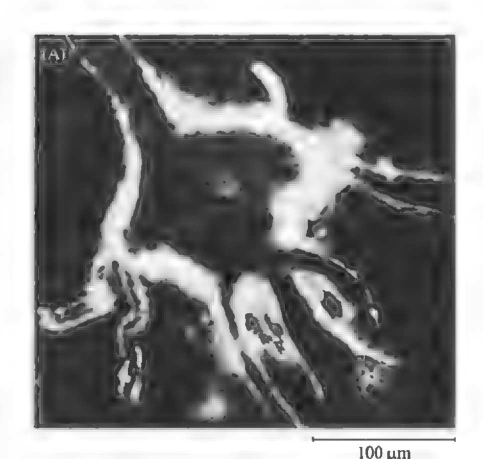
с рецепторным потенциалом, влияет на изменение частоты потенциалов действия.

Кодирование параметров стимула рецепторами растяжения

То, каким образом сенсорные рецепторы генерируют электрические сигналы, довольно давно было показано Эдрианом и Зоттерманом[7] с использованием внеклеточного отведения от сенсорных нервных волокон, идущих от мышечных рецепторов растяжения (мышечных веретен) позвоночных. Первая демонстрация связи между сенсорными стимулами и электрическими сигналами в механорецепторе была получена Катцем[8], который, регистрируя рецепторные потенциалы, показал, что растяжение вызывает деполяризацию **сенсорного окончания**. Когда рецепторный потенциал удалось зарегистрировать изолированно, путем блокады нервного разряда местным анестетиком прокаином, стало очевидно, что амплитуда этого потенциала растет как степенная функция от величины мышечного растяжения.

Рис. 17.2 показывает зависимость между амплитудой рецепторного потенциала и натяжением. В начале растяжения эта функция растет примерно на 0,1 мВ на миллиметр, но при более сильном растяжении скорость роста снижается. Чувствительность сенсорного окончания, выраженная в милливольтах на миллиметр растяжения, снижается по мере роста стимула. Многие сенсорные рецепторы используют преимущества этой нелинейной зависимости для того, чтобы обеспечить амплитудное кодирование в широком диапазоне интенсивности стимула. В таких рецепторах амплитуда ответа продолжает расти, но уже пропорционально логарифму интенсивности стимула. Это чрезвычайно полезно для таких рецепторов, как волосковые клетки и фоторецепторы, которые реагируют на стимулы, варьирующие по амплитуде на несколько порядков.

Зависимость между интенсивностью стимула и силой возникающих в ответ на него ощущений впервые описана в 1846 году Вебером. Он определял способность различать, какая из двух гирек тяжелее, держа их в разных руках, и показал, что способность к различению зависит от исходной величины гирек. То есть испытуемые были способны легко определить разницу в 3 грамма между двумя гирями, каждая из которых весила примерно по 100 грамм, тогда как килограммовые гири должны были отличаться на 30 грамм (в каждом случае различимая разница должна была быть около 3 % от веса каждого объекта). Эта зависимость была форма-



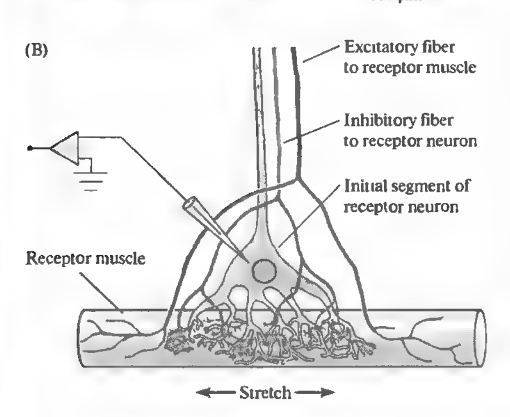


Рис. 17.3. Рецептор растяжения ракообразных. (A) Живой рецепторный нейрон при освещении в темном поле. (B) Схема связи между рецептором растяжения и мышцей при внутриклеточном отведении.

Fig. 17.3. Crustacean Stretch Receptor. (A) Living receptor neuron viewed with dark-field illumination. Distal portions of six dendrites insert into the receptor muscle, which is not visible. (B) Relation between stretch receptor neuron and muscle, indicating the method of intracellular recording. The excitatory fiber to the muscle produces contraction; the inhibitory fiber innervates the neuron. Two additional inhibitory fibers are not shown. (After Eyzaguirre and Kuffler, 1955.)

лизована Фехнером, который пришел к заключению, что такой результат предполагает логарифмическую зависимость между стимулом и ответной реакцией. Закон Вебера—Фехнера[9] — это выражение нелинейной зависимости между силой раздражителя и ощущением. Хотя точная формула соотношения зависит от модальности раздражителя, эта зависимость применима ко многим аспектам восприятия и поведения. (Например, мы можем экономить копейки, прицениваясь к карандашам, но с удовольствием переплатим лишние две-три сотни за компьютер более высокого класса.)

Рецепторы растяжения речного рака

Кодирование стимула было детально проанализировано на примере рецепторов растяжения рака Эйзагиром и Куффлером[10]. Этот препарат особенно удобен тем, что клеточное тело рецептора растяжения находится не в ганглии, а расположено изолированно на периферии, где его можно видеть в живом препарате (рис. 17.3A). Клетка достаточно велика для введения внутриклеточных микроэлектродов. Она проникает своими дендритами в ближайший тонкий мышечный тяж, а свой аксон посылает центрипетально в сегментарный ганглий (рис. 17.3B). В дополнение к этим связям, рецепторный нейрон получает тормозную иннервацию из ганглия; мышечное волокно, связанное с рецептором, в свою очередь, получает возбуждающую и тормозную эфферентную иннервацию. Таким образом, чувствительность рецептора регулируется ЦНС.

У ракообразных существует два типа рецепторов растяжения, различающихся своими структурными и физиологическими свойствами, а также тем, что они своими дендритами иннервируют различные типы мышц. Одни из них бурно активируются в начале растяжения, но затем их реакция быстро ослабевает. Такое снижение ответной реакции в процессе действия стимула постоянной интенсивности называется **адаптацией**. В противоположность **быстро адаптирующемуся** рецептору, второй тип называется **медленно адаптирующимся**; это означает, что его реакция сохраняется неизменной во время продолжительного растяжения. Реакции быстро адаптирующихся и медленно адаптирующихся рецепторов растяжения показаны на рис. 17.4. У медленно адаптирующихся рецепторов (рис. 17.4A) умеренное растяжение мышцы вызывает деполяризационный рецепторный потенциал амплитудой около 5 мВ, сохраняющийся неизменным во время растяжения. Более сильное растяжение приводит к увеличению потенциала, в результате чего

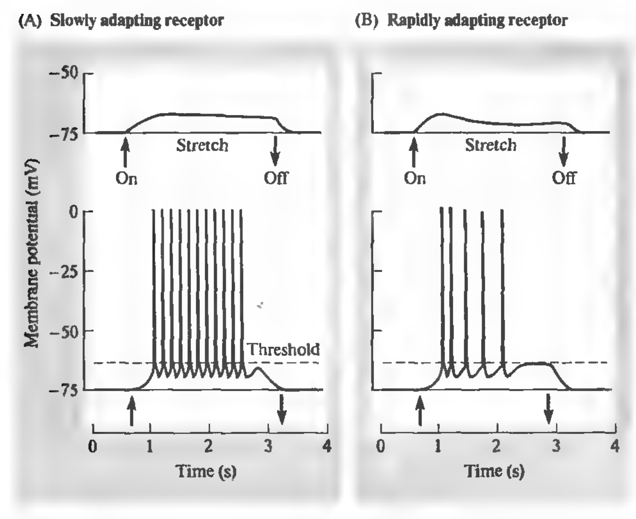


Рис. 17.4. Ответы нейронов рецептора растяжения на увеличение длины мышцы при внутриклеточном отведении, аналогичном рис. 17.3В. (А) В медленно адаптирующемся рецепторе слабое растяжение в течение 2 секунд вызывает подпороговый рецепторный потенциал. При усилении растяжения возникает серия потенциалов действия. (В) В быстро адаптирующемся рецепторе рецепторный потенциал снижается, а при более сильном растяжении снижается частота потенциалов действия.

Fig. 17.4. Responses of Stretch Receptor Neurons to increases in muscle length, recorded intracellularly as indicated in Figure 17.3B. (A) In a slowly adapting receptor, a weak stretch for about 2 s produces a subthreshold receptor potential that persists throughout the stretch (upper record). With a stronger stretch, a larger receptor potential sets up a series of action potentials (lower record). (B) In a rapidly adapting receptor, the receptor potential is not maintained (upper record), and during the large stretch the action potential frequency declines (lower record). (After Eyzaguirre and Kuffler, 1955.)

клетка деполяризуется до порогового уровня, и в ней возникает серия потенциалов действия, которые распространяются центрипетально по аксону. В быстро адаптирующемся рецепторе подобное растяжение мышцы вызывает только кратковременные ответы (рис. 17.4В).

Мышечные веретена

Рецепторы растяжения в скелетных мышцах у млекопитающих демонстрируют те же механизмы действия, что и у ракообразных. Такие рецепторы растяжения в свое время были названы анатомами **мышечными веретенами**, поскольку они по форме напоминают веретена, используемые ткачами. Особенности того, как реагируют мышечные веретена, были исследованы Мэтьюзом в начале 1930-х годов[11)–13)]. На протяжении многих лет его опыты оставались одним из лучших примеров всестороннего описания периферического органа чувств и механизмов управления его работой. Мэтьюзу удалось записать импульсы в одиночных нервных волокнах от отдельных веретен лягушек и кошек с помощью осциллоскопа, который он сконструировал для этой цели (в 1930 году это было настоящим подвигом).

Мышечные волокна в составе веретена (**интрафузальные волокна**) отличаются от основной мышечной массы (**экстрафузальных волокон**) во многих отношениях (см. обзор Ханта[14)]), включая молекулярную структуру содержащегося в них миозина[15)]. Они названы интрафузальными волокнами, от лат. *fusus* — веретено. Рис. 17.5 схематически иллюстрирует сенсорный аппарат веретен в мышцах конечности кошки. Веретено состоит из капсулы, содержащей от 8 до 10 интрафузальных волокон. В центральной, или экваториальной, области каждого волокна находится большое скопление ядер. Их расположение дает основание для классификации интрафузальных волокон, которые подразделяют на сумчатые и цепочечные волокна (bag or chain fibers), в зависимости от того, сгруппированы ли ядра в центре или распределены линейно вдоль волокна.

Два типа сенсорных нейронов иннервируют каждое мышечное веретено. Более крупные нервные волокна, афференты группы Ia, имеют диаметр от 12 до 20 мкм и проводят импульсы со скоростью до 120 м/с. (Классификация волокон, которая используется здесь и является общепринятой, приведена в главе 7.) Их терминали обвиваются вокруг центральной части как сумчатых, так и цепочечных волокон, и формируют **первичные окончания**. Более мелкие сенсорные нервы (волокна группы II) имеют диаметр от 4 до 12 мкм и проводят импульсы гораздо медленнее. Они контактируют с цепочечными волокнами, где образуют **вторичные окончания**.

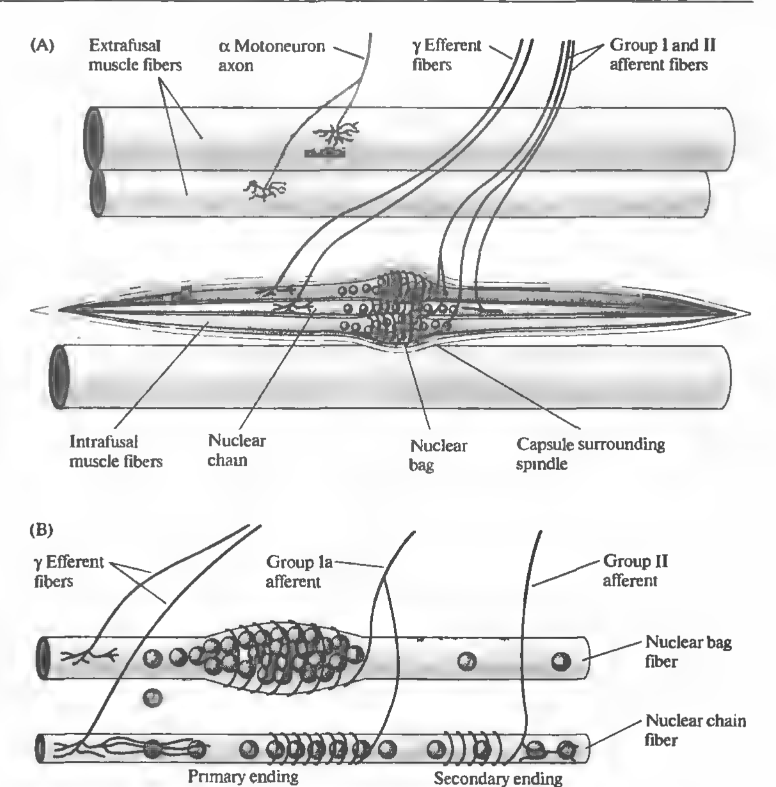


Рис. 17.5. Мышечное веретено млекопитающего. (А) Схема иннервации веретена. (В) Упрощенная диаграмма типов интрафузальных мышц и их иннервации.

Fig. 17.5. Mammalian Muscle Spindle. (A) Scheme of mammalian muscle spindle innervation. The spindle, composed of small intrafusal fibers, is embedded in the bulk of the muscle, which is made up of large muscle fibers supplied by a motoneurons. γ Motor (fusimotor) fibers supply the intrafusal muscle fibers, and group I and group II afferent fibers carry sensory signals from the muscle spindle to the spinal cord. (B) Simplified diagram of intrafusal muscle types and their innervation. (B after Matthews, 1964.)

Мышечное веретено иннервируется, кроме того, мотонейронами (**фузимоторные волокна**, или γ-мотонейроны). Они обеспечивают сокращение интрафузальных волокон и растягивают за счет этого центральную ядерную область, где расположены сенсорные окончания, вызывая в них разряд импульсов. Это взаимодействие обеспечивает механизм эфферентного контроля чувствительности мышечного веретена, который будет описан в главе 22.

Реакция на статическое и динамическое мышечное растяжение

Когда мышца, а следовательно, и находящиеся в ней веретена подвергаются быстрому растяжению, то в сенсорных волокнах групп Ia и II возникают рецепторные потенциалы и разряды импульсов. Характеристики разрядов в двух типах окончаний, однако, существенно отличаются. Первичные окончания, связанные с более крупными аксонами группы Ia, чувствительны в основном к изменениям степени растяжения. Поэтому частота разрядов в них максимальна во время динамической фазы, пока растяжение возрастает, а затем поддерживается на более низком стабильном уровне до тех пор, пока растяжение сохраняется. Вторичные окончания, связанные с более мелкими волокнами группы II, относительно слабо реагируют на изменения степени растяжения, но чувствительны к уровню статического напряжения. Такое поведение иллюстрируется рис. 17.6. Группа Ia (динамическая) и группа II (статическая) являются, соответственно, аналогами быстро адаптирующихся и медленно адаптирующихся рецепторов в мышце рака и в других сенсорных системах.

Механизмы адаптации в механорецепторах

В мышечных веретенах млекопитающих постепенное снижение деформации сенсорных окончаний обеспечивается за счет упругоэластических свойств интрафузальных воло-

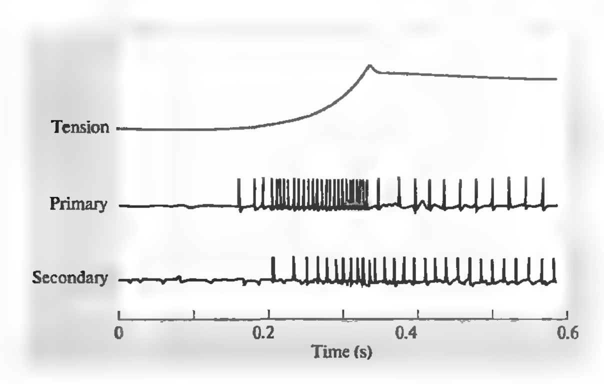


Рис. 17.6. Различия ответов мышечных веретен. Записи потенциалов действия от одиночного первичного и вторичного сенсорных афферентных волокон.

Fig. 17.6. Differences in Muscle Spindle Responses. Recordings of action potentials from single primary (group Ia) and secondary (group II) sensory afferent fibers originating in a cat muscle spindle. The primary fiber greatly increases its discharge rate as tension develops during the stretch; during the maintained phase of the stretch, it quickly adapts to a lower rate. The secondary fiber increases its firing rate more slowly as tension develops and maintains its discharge during the steady stretch. (After Jansen and Matthews, 1962.)

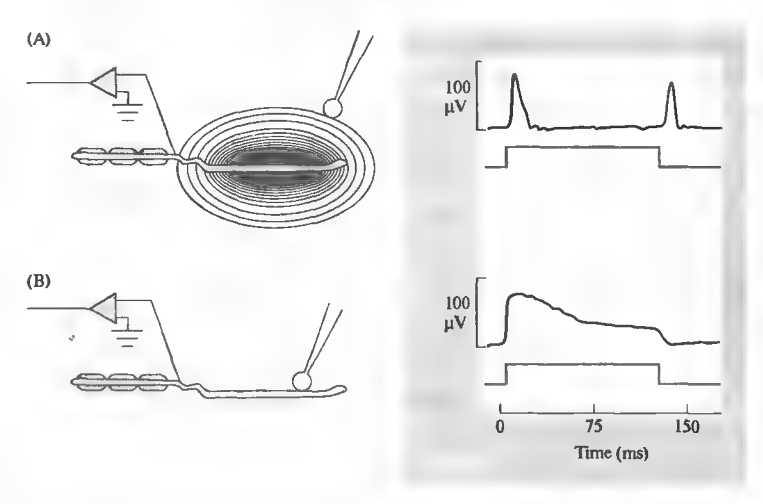
кон[17]. В рецепторах растяжения ракообразных также обнаружены разнообразные процессы, способствующие адаптации[16, 18)—20]. В медленно адаптирующемся рецепторе растяжения пачечная импульсная активность приводит к повышению внутренней концентрации натрия и к активации натрий-калиевого насоса. Создаваемый им суммарный перенос положительных зарядов из клетки во внеклеточную среду снижает амплитуду рецепторного потенциала, а вследствие этого и частоту разрядов. Еще один фактор, способствующий адаптации, — это увеличение калиевой проводимости. Например, во время серии импульсов в рецепторе растяжения рака поступление кальция через потенциалзависимые каналы вызывает открывание кальций-активируемых калиевых каналов. Результатом этого повышения калиевой проводимости является «сокращение» рецепторного потенциала, проявляющееся в уменьшении его амплитуды и частоты сенсорных импульсов.

Быстро адаптирующийся рецептор растяжения рака незамедлительно реагирует адаптацией частоты импульсации даже в ответ на экспериментально приложенный постоянный деполяризующий ток. В процессе принудительного растяжения кальций, входящий через трансдукционные каналы, активирует близлежащие кальций-зависимые калиевые каналы, обеспечивая, тем самым, гиперполяризацию клетки[21].

Адаптация в тельце Пачини

Тельце Пачини — это быстро адаптирующийся кожный механорецептор[22]. Его нервное окончание заключено в капсулу, напоминающую по форме луковицу. Если подвергать капсулу медленному сдавливанию, то никакого ответа не возникает; более быстрое сдавливание вызывает только один или два потенциала действия. Однако эти рецепторы чрезвычайно чувствительны к вибрации на частотах до 1 000/с. Хотя их обнаруживают повсеместно в подкожных тканях, особенно часто они встречаются вокруг подушечек лап и возле когтей млекопитающих, а также в межкостных связках, соединяющих кости в передних и задних конечностях, где они действуют как чувствительный детектор колебаний почвы[23]. Сходное образование, тельце Хербста, обнаружено у птиц в ногах, клювах и в кожной ткани (а у дятлов — даже в языке!). В качестве примеров выполняемых ими физиологических функций можно привести восприятие уткой с помощью клюва колебаний воды, вызываемых ее мелкой добычей, и определение парящей птицей вибраций оперения, возникающих в полете из-за незначительных аэродинамических отклонений[24].

Механизм адаптации в тельце Пачини был детально изучен Вернером Левенштейном и его сотрудниками, которые показали, что это происходит отчасти благодаря динамическим свойствам капсулы[25]. Когда на изолированную интактную капсулу наносили пульсирующее механическое воздействие, то короткий рецепторный потенциал возникал в начале и в конце каждого биения (рис. 17.7А). Ответы на постоянное давление столь кратковременны, поскольку сжатие чувствительного окончания ослабляется благодаря перераспределению жидкости в капсуле. После того как капсулу осторожно удалили с нервного окончания, рецепторный потенциал начал медленно спадать во время пульсового сти-



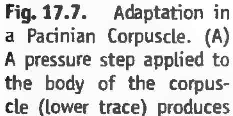


Рис. 17.7. Адаптация в тельце Пачини. (А) Скачок давления, приложенный к тельцу, вызывает быстро адаптирующийся рецепторный потенциал. Аналогичный ответ возникает в момент снятия давления. (В) После удаления капсулы давление, приложенное к нервной терминали, вызывает рецепторный потенциал, длящийся до конца раздражения.

Fig. 17.7. Adaptation in a Pacinian Corpuscle. (A) A pressure step applied to the body of the corpuscle (lower trace) produces a rapidly adapting receptor potential (upper trace), as a result of a transient wave of deformation that travels through the capsule to the nerve terminal. A similar response occurs on removal of the pulse. (B) After removal of the capsule layers, pressure applied to the nerve terminal produces a receptor potential that lasts for the duration of the pulse. (After Loewenstein and Mendelson, 1965.)

мула (рис. 17.7В). Тем не менее, даже когда рецепторный потенциал был пролонгирован, в афферентном аксоне все равно возникала лишь короткая вспышка потенциалов действия (на рисунке не показано); это означает, что свойства аксона как такового совпадают со свойствами интактного рецептора.

§ 2. Трансдукция механических стимулов

Очевидно, что должны существовать чувствительные к растяжению ионные каналы, расположенные на механочувствительных нервных окончаниях, где генерируется рецепторный потенциал. Более того, эти каналы трансдукции должны отличаться от каналов, обеспечивающих генерацию потенциала действия, поскольку ответы на растяжение сохраняются в присутствии местного анестетика, который блокирует распространение возбуждения. Механочувствительные ионные каналы обнаружены в самых разнообразных клетках и органах, включая эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, барорецепторы в каротидном синусе, рецепторы прикосновения и давления в коже, мышечные рецепторы растяжения и механочувствительные волосковые клетки внутреннего уха[26)—28)].

Методом фиксации напряжения было показано, что токи, лежащие в основе рецепторного потенциала в рецепторах растяжения рака, обусловлены увеличением проницаемости как для натрия и калия[29, 30)], так и для двухвалентных катионов[31)], а также для более крупных органических катионов, таких как трис (три[гидроксиметил]аминометан) и аргинин. Увеличение проводимости, вызванное растяжением, не чувствительно к тетродотоксину[32)], однако подвержено влиянию некоторых местных анестетиков[33)]. Рецепторные потенциалы в мышечных веретенах позвоночных также связаны с увеличением катионной проницаемости[34)].

Одиночные каналы, активируемые прогибанием мембраны (membrane distortion), впервые наблюдали в мембранных кусочках (пэтчах) из эмбриональных мышечных клеток цыпленка[35)] и в мембранах других клеток, не имеющих отношения к сенсорной трансдукции[36)]. Пэтч-отведения активности похожих каналов, сделанные на первичных дендритах рецептора растяжения рака[37)], показывают, что относительные проницаемости этих каналов для натрия, калия и кальция согласуются с более ранними наблюдениями, сделанными на целой клетке. О том, как деформация мембраны вызывает открывание каналов, пока почти ничего не известно.

Механочувствительные волосковые клетки уха позвоночных

Наше понимание механотрансдукции продвинулось дальше всего в изучении волосковых клеток позвоночных. Механочувствительные **волосковые клетки** внутреннего уха реагируют на акустическую вибрацию или движения головы, вызывающие перемещение жидкости в полостях внутреннего уха. Точная форма перемещения жидкости зависит от конфигурации и состава конкретного концевого органа, задействованного в каждом процессе. В главе 18 мы обсуждаем частотно-специфичный паттерн колебаний мембран в спирали улитки и различные функции внутренних и внешних волосковых клеток для слухового восприятия. Здесь достаточно будет указать, что волосковые клетки в улитке (**cochlea**) стимулируются движениями жидкости в диапазоне акустической частоты — у человека от 20 до 20000 Гц. Вестибулярные концевые органы внутреннего уха построены совершенно иначе и реагируют на гораздо более низкие частоты, возникающие при движениях головы. Гравитационная нагрузка на мешочек (saccule) и маточку (utricle), создаваемая содержащей кристаллики **отолитовой мембраной** (otolithic membrane), обеспечивает чувствительность этих эпителиальных структур к линейному ускорению. Волосковые клетки в полукружных каналах (semicircular canals) активируются угловым ускорением при вращении головы. Независимо от типа движения, перемещение жидкости вызывает отклонение пучка модифицированных микроворсинок, или стереоцилий, которые отходят от апикальной

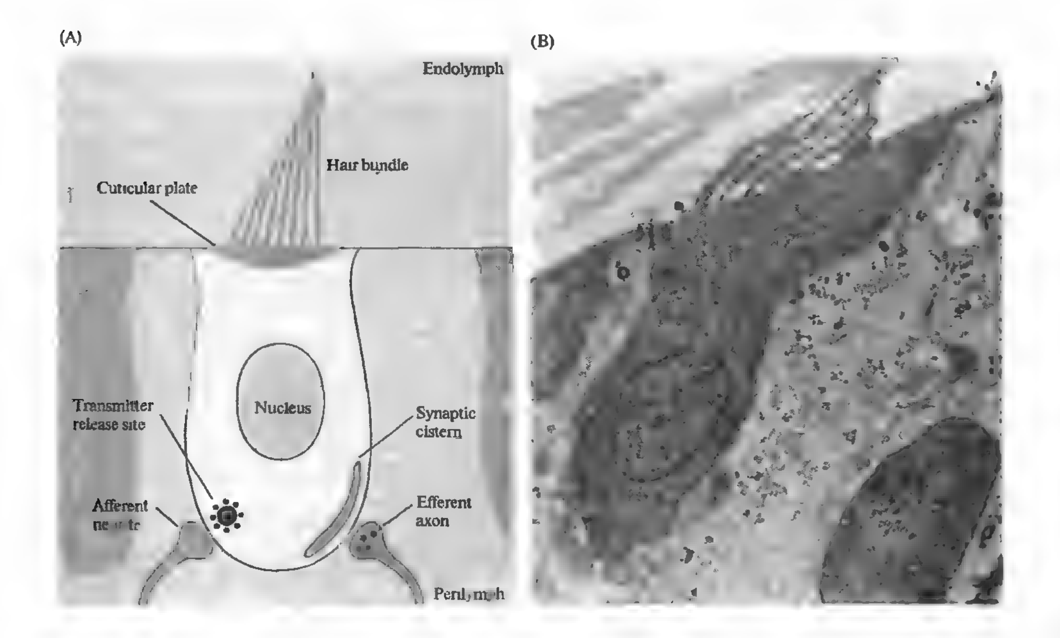


Рис. 17.8. Механочувствительная волосковая клетка. (А) Схема функциональной специализации волосковой клетки. (В) Электронная микрофотография волосковой клетки из внутреннего уха цыпленка.

Fig. 17.8. The Mechanosensory Hair Cell. (A) Schematic drawing highlighting the functional specializations of the hair cell. A bundle of specialized microvilli called stereocilia projects from the cuticular plate into the endolymphatic space. In some hair cells a true cilium, the kinocilium, is found at one side of the hair bundle. Below the nucleus, hair cells form synapses with afferent and efferent neurons. Synaptic vesicles surround a dense body opposite the ending of an afferent neuron. Efferent neurons projecting from the brainstem form cholinergic synapses. Inside the hair cell a synaptic cistern lies in close apposition to the plasma membrane underlying the efferent contact. (B) Transmission electron micrograph of a hair cell from chick inner ear. The hair bundle was bent over during fixation. In this type of hair cell the cuticular surface is expanded. Synaptic contacts are made on the basal pole of the cell. (Micrograph kindly provided by R. Michaels.)

поверхности волосковой клетки. Отклонение пучка напрямую приводит к открыванию механочувствительных ионных каналов.

Структура рецепторов волосковых клеток

Волосковые клетки и окружающие их вспомогательные клетки формируют эпителиальные слои, которыми отделены друг от друга разнородные жидкие среды внутреннего уха. Базально-латеральные участки мембраны волосковых клеток омываются перилимфой, сходной по составу с обычной внеклеточной жидкостью, содержащей много натрия и мало калия (рис. 17.8). Апикальная поверхность волосковой клетки, формирующая волоски, повернута в сторону эндолимфы, раствора, сходного определенным образом с цитоплазмой и содержащего калий в высокой концентрации, а натрий и кальций — в низкой. Волосковые клетки на своих базально-латеральных поверхностях формируют синаптические контакты с афферентными волокнами. Некоторые волосковые клетки также получают синаптические входы от эфферентных нейронов ствола мозга.

На волосковых клетках разных типов, независимо от места их расположения, находится от нескольких десятков до сотен ранжированных по высоте стереоцилий (видоизмененных микроворсинок, содержащих филаменты полимеризованного актина). Самые длинные стереоцилии обнаружены на волосковых клетках полукружных каналов, самые короткие — в высокочастотной области улитки. В составе любого пучка стереоцилии расположены в порядке повышения высоты, как трубы органа или как ступеньки лестничного марша. Во многих волосковых клетках находится только один настоящий волосок, киноцилий (содержащий набор из 9+2 микротрубочек), который находится возле центра самого высокого ряда стереоцилий. В волосковых клетках улитки киноцилии присутствуют только в раннем онтогенезе, позже они исчезают. Стереоцилии закреплены своим основанием в покровной пластинке. Во время отклонения пучка стереоцилии ведут себя как жесткие удилища и сгибаются только в месте прикрепления[38]. Разнообразные боковые сочленения способствуют тому, что скопление стереоцилий перемещается как единый волосковый пучок.

Трансдукция через отклонение волоскового пучка

Уже несколько лет известно, что электрические реакции в волосковых клетках возникают благодаря деформации волоскового пучка[39, 40], однако для непосредственного экспериментального подтверждения этого потребовалась разработка чувствительной аппаратуры, которая могла бы вызвать и измерить ничтожно малые перемещения при отведении от волосковых клеток. Слуховой и вестибулярный эпителий холоднокровных позвоночных, таких как черепахи и лягушки, оказался наиболее удобным для проведения таких опытов. Процедуры, использованные Кроуфордом и Феттиплейсом для стимуляции волосковых клеток в базальном сосочке (basilar papilla) черепахи (слуховой эпителий, аналог органа Корти у млекопитающих), показаны на рис. 17.9А. Базальные сосочки были извлечены из внутреннего уха и помещены в солевом растворе в камеру, смонтированную на предметном столике микроскопа. Микроэлектрод записывает потенциал мембраны волосковой клетки, в то время как стекловолокно, прикрепленное к пьезоэлектрическому манипулятору, давит на пучок волосков. Проецируя изображение стекловолокна на пару фотодиодов, можно уловить смещения всего на 1 нм. Такой стимул производит в волосковой клетке изменение потенциала величиной в 0,2 мВ[41].

Хадспет и его коллеги детально описали процесс трансдукции в вестибулярных волосковых клетках лягушки[42)—44]. В одной из серий экспериментов они непосредственно продемонстрировали функциональную ориентацию волоскового пучка, варьируя направление стимуляции, осуществляемой пьезоэлектрическим манипулятором. Отклонения в сторону киноцилия деполяризовали клетку, тогда как движение от него приводили к гиперполяризации. Отклонение пучка в направлении, перпендикулярном этой оси, не вызвало изменений мембранного тока[45]. Результаты такого эксперимента приведены на рис. 17.9В, где величина изменения потенциала, генерируемого в волосковой клетке, изменяется в зависимости от угла отклонения пучка.

Концевые связи и воротные пружины

Какая структурная особенность волоскового пучка могла бы лежать в основе ориентаци-

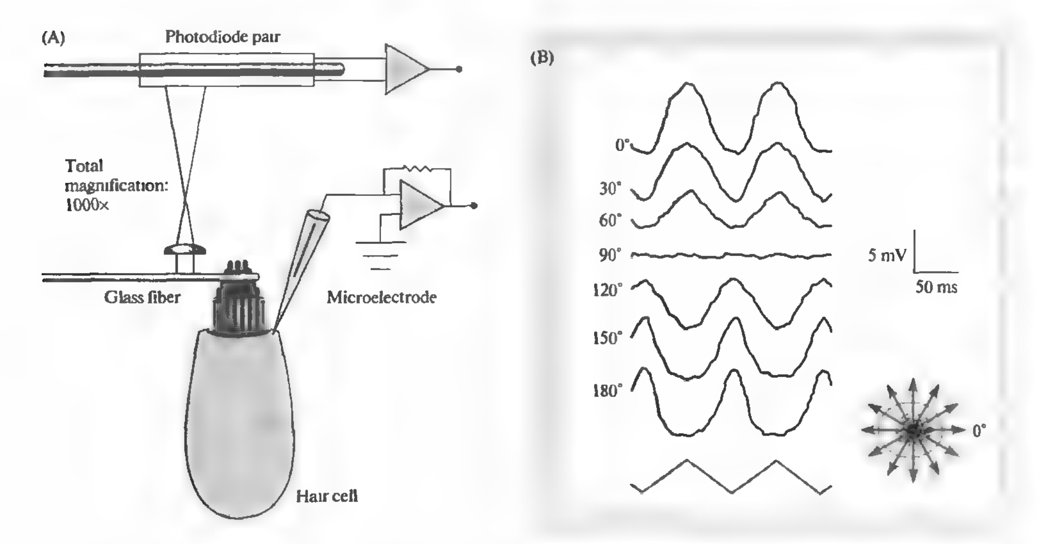


Рис. 17.9. Регистрация механотрансдукции в волосковых клетках. (А) Микроэлектрод, введенный в изолированную волосковую клетку. (В) Рецепторные потенциалы, зарегистрированные в волосковой клетке изолированного мешочка лягушки при разных углах отклонения пучка. Положение киноцилии соответствует 0°.

Fig. 17.9. Recording Mechanotransduction in Hair Cells. (A) Microelectrodes are inserted into hair cells in an excised epithelium mounted on the stage of a compound microscope. The hair bundle is displaced by a glass fiber attached to a piezoelectric manipulator. The image of the glass fiber is enlarged and projected onto a photodiode pair so that motion causes a differential signal between them. Movements as small as 1 nm can be detected with this method. (B) Receptor potentials recorded from a hair cell in the excised saccule of a frog during bundle deflection at various angles. The kinocilium at the center of the tallest row of hairs lies at 0°. Maximal responses occur for motion toward and away from the kinocilium; no response is seen during motion at right angles to that line. (A after Crawford and Fettiplace, 1985; B after Shotwell, Jacobs, and Hudspeth, 1981.)

онной избирательности трансдукции? Пикльз и коллеги, используя сканирующий электронный микроскоп, описали уникальный класс внеклеточных связей, соединяющих верхушки одного волоска с боковой поверхностью соседнего, более длинного волоска[46]. Эти **концевые связи** (рис. 17.10А) наблюдались только вдоль оси механической стимуляции (т. е. ориентированы вверх и вниз по «лестнице»). Положение концевых связей позволяет предположить, что они могут быть вовлечены в механотрансдукцию, а воздействие, разрывающее концевую связь, должно прекращать трансдукцию[47, 48]. Действительно, внеклеточные отведения указывают на то, что каналы, активируемые механическим стимулом, расположены вблизи вершины волоскового пучка[49]–[51].

Количественные измерения трансдукции и идентификация концевых связей были объединены в гипотезе **воротной пружины** (gating spring), описывающей механизм механотрансдукции в волосковых клетках. Отклонение волоскового пучка в «позитивном» направлении (в сторону более высоких волосков) увеличивает расстояние между концами волосков, растягивает воротную пружину, открывая таким образом ворота каналов трансдукции (рис. 17.10В). Когда пучок смещается в сторону, противоположную более длинным волоскам, происходит сжатие пружины, и каналы закрываются. Хотя такая схема может показаться достаточно идеализированной, однако требование прямой физической связи между механикой пучка и открыванием канала диктуется огромной скоростью, с которой в волосковых клетках происходит трансдукция, имеющая постоянную времени открывания около 40 мкс[52, 53]. К тому же энергетика и механика трансдукции согласуются с данной моделью. Например, можно измерить уменьшение жесткости пучка по мере того, как открываются каналы трансдукции, так, будто это молекулярное движение действительно снимает напряжение с воротной пружины[54].

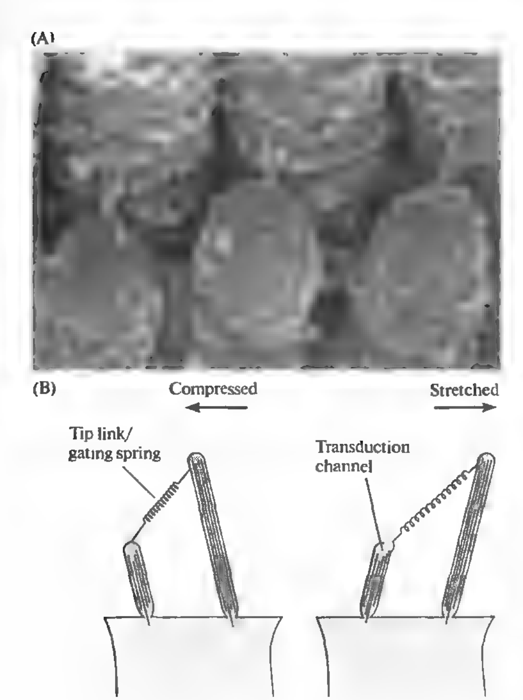


Рис. 17.10. Концевые связи в стереоцилии волосковой клетки. (A) Изображение связей между стереоцилиями, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа. (B) Концевые связи расположены так, что отклонение волоскового пучка в возбуждающем направлении растягивает концевую связь и открывает трансдукционный канал (справа), тогда как противоположно направленное движение сжимает концевую связь (слева).

Fig. 17.10. Tip Links on Hair Cell Stereocilia. (A) Scanning electron micrograph showing extracellular fibers that run from the tips of shorter stereocilia to the sides of adjacent taller stereocilia. In some cases these appear to bifurcate. (B) Tip links are positioned so that deflection of the hair bundle in the excitatory direction stretches the tip link and pulls open the transduction channel (right), while the opposite motion compresses the tip link (left). The orientation of the tip link is appropriate to serve as a gating spring that pulls directly on the gate of the mechanical transduction channel. (Micrograph kindly provided by D. Furness.)

Каналы трансдукции в волосковых клетках

Какого типа каналы открываются на концах волосковых клеток? Оказалось, что это неизбирательные катионные каналы, имеющие значительную кальциевую проводимость. Проводимость одиночного канала — около 100 пСм[53, 55, 56]. На основании этих данных, а также измерений величины общего генераторного тока можно рассчитать, что каждая волосковая клетка имеет около 100 каналов трансдукции. Это соответствует всего нескольким каналам на один стереоцилий!

Очень малое количество канвлов в каждой волосковой клетке существенно затрудняет их биохимическое и молекулярно-биологическое исследование. Каналы трансдукции волосковых клеток не являются потенциалзависимыми и не открываются какими-либо лигандами в традиционном смысле этого слова. Поэтому маловероятно, что возможна жесткая гомологичность между ними и другими классами управляемых ионных каналов, для которых гены уже описаны. Однако все больше механочувствительных ионных каналов клонируется из бактерий, дрожжей, нематод и мух[27, 28], так что гены-претенденты, скорее всего, будут определены в ближайшем будущем.

Адаптация волосковых клеток

Волосковые клетки чрезвычайно чувствительны, пороговые ответы в них возникают при смещении волоскового пучка менее чем на 10^{-9} м. Поэтому кажется весьма вероятным, что некоторые виды адаптивных процессов должны восстанавливать чувствительность в присутствии «фоновых» стимулов. Например, вестибулярные волосковые клетки в маточке и мешочке должны оставаться чувствительными к самым незначительным движениям головы, испытывая постоянное влияние силы тяжести, действующей на покровную отолитовую мембрану. Путем прямого измерения можно показать, что в процессе длительного смещения волосковые клетки действительно адаптируются.

Рис. 17.11 показывает результат эксперимента, в котором постоянное отклонение на 0,65 мкм было приложено к пучку ресничек волосковой клетки черепахи, мембранный потенциал в которой устанавливался на разных уровнях путем фиксации напряжения. При −72 мВ входящий трансдукционный ток сначала достигал на пике 100 пА, а затем спадал с постоянной времени примерно 10 мс. Это адаптивное изменение вызвано притоком ионов кальция через открытые трансдукционные каналы. Когда потенциал мембраны был фиксирован на +60 мВ, то возникал выходящий трансдукционный ток (равновесный потенциал равен 0 мВ), который сохранялся

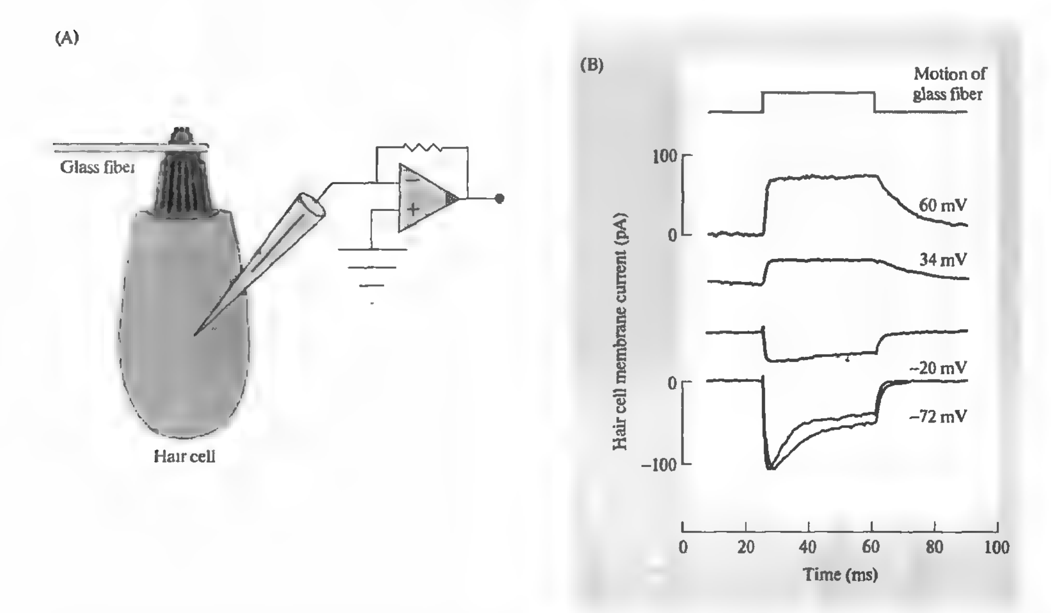


Рис. 17.11. Адаптация генераторного тока в волосковых клетках. (A) Схема опыта. (B) Мембранные потенциалы волосковых клеток в процессе механотрансдукции. При отрицательных мембранных потенциалах ток был входящим и спадал во время раздражения. При положительных мембранных потенциалах ток менял направление и не спадал; вход кальция также снижался, устраняя кальций-зависимую адаптацию.

Fig. 17.11. Adaptation of Transducer Current in Hair Cells. (A) A sustained deflection of the hair bundle was imposed with a piezoelectric manipulator, and transducer current was recorded by voltage clamp. (B) Membrane currents recorded from a hair cell during mechanotransduction. At negative membrane potentials the current was inward and decayed during the displacement. At positive membrane potentials the current was reversed in polarity and showed no decay; calcium influx is also reduced, so calcium-dependent adaptation is eliminated. (After Crawford, Evans, and Fettiplace, 1989.)

неизменным, адаптация при этом устранялась. При +60 мВ движущая сила для кальция мала, и в клетку проникает небольшое количество кальция. В других экспериментах адаптация также устранялась удалением кальция из внеклеточного раствора или внутриклеточной инъекцией сильных кальциевых хелаторов[57].

В некоторых волосковых клетках адаптация сопровождается изменениями жесткости пучка, что предполагает «переустановку» жесткости воротной пружины[58]. Это наблюдение, в сочетании с кальциевой зависимостью адаптации, привело к предположению, что движение миозина вдоль актинового каркаса стереоцилии может смещать положение места прикрепления концевой связи, изменяя жесткость пучка[59]. Путем клонирования миозинов из внутреннего уха[60] и использования специфических антител, было показано, что миозин Iβ (немышечная форма) расположен вблизи концов стереоцилий в волосковых клетках лягушки[61]. Эта относительно медленная адаптация, основанная на действии миозина, вероятно, является наиболее значимой в вестибулярных волосковых клетках. Более быстрая форма адаптации в слуховых волосковых клетках обусловлена ионами кальция, действующими непосредственно на трансдукционные каналы, заставляя их закрываться[62].

Тесная связь между механическим входом и открыванием трансдукционного канала имеет важные последствия для функции внутреннего уха. Такая тесная связь предполагает, что в процессе трансдукции будет возникать отрицательная обратная связь. Таким образом, рецепторный потенциал изменяет вход кальция (через изменение движущей силы), приводя к изменениям жесткости или положения волоскового пучка. Действительно, изменение мембранного потенциала волосковых клеток черепахи приводит волосковый пучок в движение[41].

Активная механика волосковых клеток может способствовать проявлению некоторых необычных свойств слуха, включая звуки (называемые отоакустическими излучениями), которые могут исходить из ушей большинства видов, включая человека[63]. Способность уха излучать звук дала аудиологам возможность напрямую оценивать функции волосковых клеток, даже у младенцев или коматозных больных[64].

§ 3. Обоняние

Механотрансдукция в ухе достигает высокой чувствительности благодаря тесной связи энергии стимула и мембранного потенциала волосковой клетки. В противоположность этому, большая чувствительность обоняния, зрения и некоторых форм вкусовых ощущений достигается благодаря химическому усилению — то есть механизму вторичных посредников, в котором ферментативные каскады производят большое количество промежуточных продуктов, тысячекратно увеличивая тем самым эффект единственной активированной рецепторной молекулы.

Обоняние слабо развито у человека по сравнению с собаками, свиньями и бабочками. Но в то же время значительными усилиями (и рекламным временем) создается то, что можно рассматривать как обонятельное поведение человека (если принять во внимание количество сортов мыла, деодорантов, духов, которые призваны обеспечить социально приемлемый личный букет запахов). Обонятельные сигналы существенно важны для человеческого выживания, стимуляции питания, воспроизведения и связи «мать — дитя»[65, 66]. Кроме того, обонятельные стимулы имеют сильную способность пробуждать эмоции и извлекать давно хранимые воспоминания (возможно, как наследие эволюции, от использования обонятельных меток для нахождения дома, как у других видов)[67]. Навязчивый характер обонятельной памяти был описан Марселем Прустом в «Воспоминании о прошлом»:

Когда от отдаленных воспоминаний ничего не остается;
Когда уже люди мертвы;
Когда вещи разбиты и потеряны;
Все же остаются еще, более хрупкие,
Но гораздо более живые,
Более невещественные,
Но более постоянные, более верные,

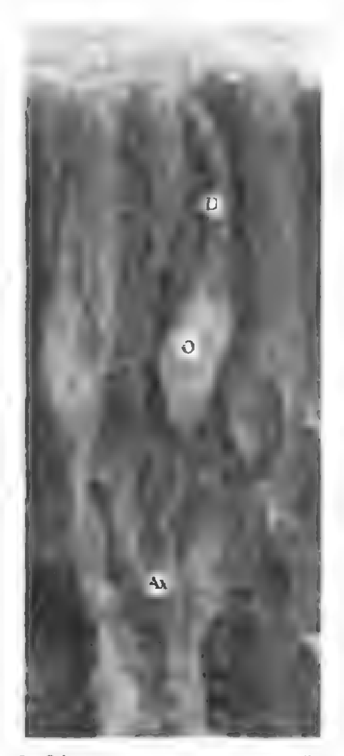


Рис. 17.12. Обонятельные рецепторные нейроны. Электронная микрофотография обонятельного эпителия хомяка.

Fig. 17.12. Olfactory Receptor Neurons. Scanning electron micrograph of the olfactory epithelium of a hamster. Each receptor neuron (O) has a long dendrite (D) that extends to the surface and an axon (Ax) that projects from the epithelium to the olfactory bulb. The long sensory cilia at the tip of the dendrite form a dense mat in this preparation and are not individually resolved. (Micrograph kindly provided by R. Costanzo.)

Запах и вкус остаются в воздухе навсегда,
Как призраки, готовые напомнить нам...

Выявление и различение уникальной смеси индивидуальных запахов, связанной с этими воспоминаниями, начинается с семейства молекулярных рецепторов в обонятельных рецепторных нейронах.

Обонятельные рецепторы

У позвоночных животных запахи выявляются структурой, содержащей примерно 100 000 обонятельных рецепторных нейронов, аксоны которых проецируются через тонкий участок фронтального черепа (ситовидную пластинку) в обонятельную луковицу (рис. 17.12).

Длинные реснички обонятельных рецепторов достигают носовой полости, где они лежат в слизистом слое (mucus), толщиной у человека около 50 мкм, который полностью замещается каждые 10 минут. Слизистый слой защищает сенсорный эпителий, вымывая потенциально токсичные летучие соединения, и все одоранты должны просачиваться через него, чтобы достигнуть сенсорных ресничек. Одоранто-связывающий белок помогает концентрировать гидрофобные одоранты в этом насыщенном водой слое[68]. Обонятельные рецепторы необычны тем, что они постоянно сменяются на протяжении жизни животного. Каждый рецептор живет один или два месяца, и новые рецепторы переходят из слоя базальных клеток в обонятельный эпителий[69].

Обонятельный ответ

Первые отведения обонятельных ответов были сделаны Эдрианом[70] и Оттосоном[71]. Позже были получены доказательства того, что молекулы одоранта взаимодействуют с рецепторами в мембране реснички, вызывая увеличение проводимости, приводящее к деполяризации. Затем потенциалы действия передаются по аксону обонятельной рецепторной клетки в центральную нервную систему. Методом пэтч-клампа были зарегистрированы одорант-индуцированные токи изолированных обонятельных клеток[72] и изучены точный временной ход и место возникновения обонятельного ответа.

Пример такого эксперимента на клетке, изолированной из обонятельной слизистой оболочки саламандры[73], показан на рис. 17.13. Потенциал мембраны клетки фиксирован на −65 мВ, и раствор, содержащий смесь молекул одоранта (примерно 0,1 ммоль) в 100 ммоль KCl, подается из второй пипетки короткими (35 мс) импульсами давления — сначала на сому, потом на дистальную часть дендритов и ресничек. Раствор, подаваемый из пипетки на сому, вызывает быстрый входящий ток, благодаря локальному увеличению концентрации калия. Временной ход калиевого ответа обусловлен соотношением скоростей аппликации и последующего разведения раствора за счет диффузии внутри ванночки. Второй, меньший и более медленный входящий ток появляется, когда одорант достигает апикального дендрита.

Раствор, подаваемый на апикальный дендрит и реснички, производит лишь незначительный калиевый ответ, поскольку, предположительно, в этой части клетки меньше калиевых каналов. Однако сам одорант вызывает большой входящий ток, который превышает время аппликации на несколько секунд. Эксперимент ясно показывает, что область чувствительности к одоранту — это дистальный дендрит и реснички, и пролонгированный временной ход дендритного ответа согласуется с идеей, что изменение проводимости обусловлено системой вторичных посредников.

Каналы обонятельных рецепторов, управляемые циклическими нуклеотидами

Деполяризация, вызываемая молекулами пахучих веществ, обусловлена открыванием неселективных катионных каналов[74] и дополнительным протеканием тока через кальций-активируемые хлорные каналы[75, 76]. Неселективные катионные каналы в обонятельных рецепторах открываются внутриклеточным цАМФ (рис. 17.14), и эти каналы тесно связаны с катионными каналами, открываемыми цГМФ (циклическим гуанозин-монофосфатом) в палочковых фоторецепторах[77]. Как и фоторецепторный канал палочек (глава 19), обонятельный рецепторный канал не способен ни активироваться, ни инактивироваться изменениями потенциала мембраны. Эти каналы проницаемы для ионов Na^+, K^+ и Ca^{2+}. Вход кальция может способствовать процессам адаптации. Благодаря очень высокому входному сопротивлению обонятельных рецепторов, для возникновения потенциала действия в них достаточно всего нескольких открытых катионных каналов. Это позволяет предположить, что даже одна молекула одоранта может быть распознана рецептором[78].

Сопряжение рецептора с ионными каналами

Как связывание одоранта с рецептором сопрягается с открыванием цАМФ-зависимых катионных каналов? Существует предположение, что одорант предпочтительно связывается с теми молекулярными рецепторами, которые сопряжены с G-протеином. Активированный G-протеин высвобождает α-субъединицу, которая стимулирует аденилил-циклазу, синтезирующую цАМФ (рис. 17.14). Идентифицировано обширное семейство претендентов на роль генов обонятельного рецептора[79],

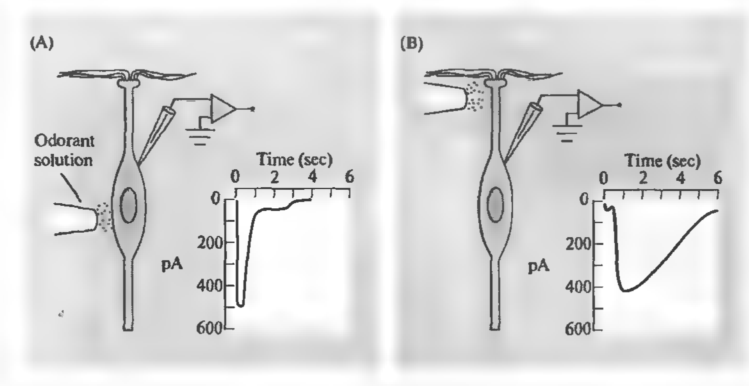


Рис. 17.13. Ответы изолированных обонятельных клеток саламандры. Пэтч-кламп отведение от целой клетки. (А) При аппликации раствора на тело клетки возникает кратковременный входящий ток, обусловленный повышением концентрации калия. Второй, более медленный и меньший компонент обусловлен действием одоранта, достигающего удаленных дендритов в процессе диффузии. (В) При аппликации раствора на дендрит первый компонент исчезающе мал, а второй медленный компонент возрастает и длится в течение нескольких секунд после отмывки раствора одоранта.

Fig. 17.13. Responses of Isolated Olfactory Cells from the salamander. A patch clamp electrode is used to record whole-cell current. A solution containing 0,1 m*M* odorant mixture in 100 m*M* KCl is applied to the cell by a brief (35 ms) pressure pulse. (A) When solution is applied to the cell body, there is a rapid transient inward current due to the increased KCl concentration, followed by a smaller, slower current as the odorant reaches the apical end of the dendrite. The time course of the fast inward current is indicative of the time course of application and dissipation of the electrode solution. (B) When the solution is applied to the dendrite, there is only a small rapid current due to the KCl, but a large current, due to the odorant, lasts for several seconds after the electrode solution has washed away. (After Firestein, Shepherd, and Werblin, 1990.)

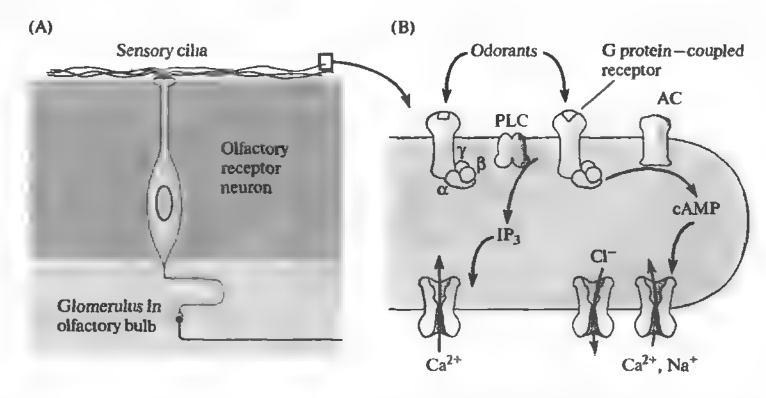


Рис. 17.14. Трансдукция в обонятельной ресничке. (А) Схема восприятия запаха. (В) Система вторичных посредников в обонятельной ресничке.

Fig. 17.14. Transduction in Olfactory Cilia. (A) The molecular receptors for olfactants are found in sensory cilia that project into the mucous layer of the olfactory epithelium. Depolarizing receptor potentials in these long receptors give rise to action potentials that propagate along the olfactory receptor neuron's axon into the central nervous system. (B) Odorant molecules bind to specific G protein-coupled receptors in the plasma membrane of the olfactory cilia. This frees the a subunit to activate adenylyl cyclase (AC) and raise the concentration of cAMP, which causes nonselective cation channels to open, depolarizing the membrane. Calcium-gated chloride current can enhance this effect. Other pathways may involve the activation of phospholipase C (PLC) and the consequent rise in IP_3 to act directly on plasma membrane calcium channels.

которые кодируют трансмембранные белки, сопряженные с G-протеином, сходные по структуре с метаботропными нейрональными рецепторами (глава 10). Величайшее разнообразие кодируемых белков возникает за счет последовательности трех трансмембранных доменов, которые формируют лиганд-связующий карман. Был идентифицирован[80)] G-протеин, специфично экспрессируемый в обонятельном эпителии (G_{olf}). Высвобождение $G_{olf\alpha}$ при связывании одорантов вызывает повышение активности обонятельной аденилил-циклазы, которая содержится в большом количестве в обонятельных ресничках[81, 82)].

Об эффективности этих путей трансдукции свидетельствует быстрое появление цАМФ. Брир и его коллеги[83)], используя ме-

тод stop-flow, показали, что за 50 мс аппликации одоранта в препарате изолированной обонятельной реснички происходит 10-кратное увеличение концентрации цАМФ. Существуют также подтверждения того, что обонятельные нейроны используют в процессе трансдукции G-протеиновую активацию фосфолипазы С и продуцируют IP_3 (инозитол трифосфат)[84]. В этом случае IP_3 может напрямую открывать кальциевые каналы в плазматической мембране[85]. IP_3 особенно важен для обоняния у беспозвоночных[86]. Роль IP_3 в обонянии млекопитающих менее ясна, о чем можно судить на том основании, что у трансгенных мышей, лишенных цАМФ-регулируемых каналов, полностью отсутствует способность различать запахи[87].

Специфичность одорантов

Люди могут различать очень большое число запахов, и существование сотен, а возможно, и тысяч обонятельных рецепторных молекул может служить предпосылкой этой способности. Проблема лишь в отсутствии одорантной специфичности индивидуальных обонятельных рецепторных нейронов, каждый из которых распознает определенный спектр запахов, а не является высоко избирательным[88]. Один из подходов к пониманию этого вопроса состоит в том, чтобы методом *in situ* гибридизации определить паттерн экспрессии рецепторных молекул, клонируемых обонятельными рецепторными нейронами. Рецептор каждого конкретного одоранта локализован в строго ограниченной области обонятельного эпителия[89, 90]. Различные семейства рецепторных генов оказались экспрессированными в зонах, вытянутых по длине эпителия (рис. 17.15), при этом каждый конкретный ген экспрессировался ограниченным числом обонятельных рецепторных нейронов.

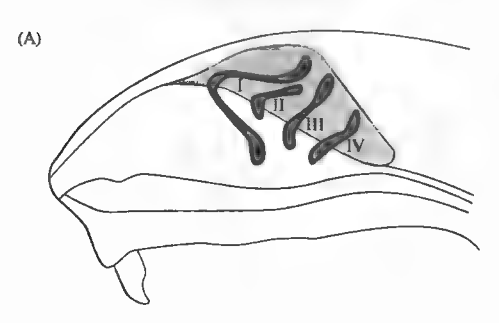


Рис. 17.15. (Рис. 17.15В см. на цветной вклейке после с. 640.) Экспрессия генов рецепторов специфических одорантов в подгруппах обонятельных рецепторных нейронов. (А) Обонятельный эпителий крысы, расположенный в складках носовой полости. (В) Полоски обонятельных рецепторных нейронов, меченных специфичными антителами.

Fig. 17.15. Expression of Specific Odorant Receptor Genes by Subsets of Olfactory Receptor Neurons. (A) The olfactory epithelium of a rat lies on a series of convolutions of the nasal cavity called turbinates-labeled I to IV. (B) Bands of olfactory receptor neurons label positively for olfactory receptor mRNAs. Probes for different mRNAs label nonoverlapping populations of neurons (depicted as green, yellow, blue, and white dots). (After Vassar, Ngai, and Axel, 1993; B kindly provided by R. Vassar.)

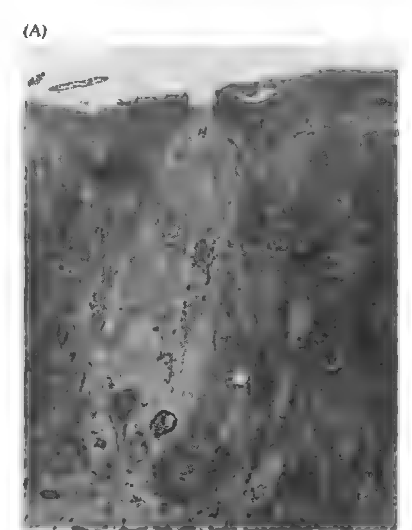
В дополнение к основному обонятельному эпителию, млекопитающие обладают сошниково-носовым (vomeronasal) органом, который участвует в различении феромонов, стимулирующих спаривание и другие виды поведения. Вомероназальные рецепторные нейроны проецируются в дополнительную обонятельную луковицу, нейроны которой, в свою очередь, проецируются в лимбическую систему. Вомероназальные нейроны экспрессируют два дополнительных семейства обонятельных рецепторов. В них имеются также G-протеин-сопряженные рецепторы, но они отличаются от тех, которые экспрессируются в основном обонятельном эпителии. Каждый вомероназальный нейрон может экспрессировать лишь один тип молекулярного рецептора, при этом паттерн экспрессии у самок и самцов крыс различен[91].

§ 4. Механизмы вкуса

Описание механизмов вкуса и запаха часто объединяют, потому что оба ощущения активируются химическими стимулами, приходящими из внешнего мира. Действительно, некоторые вкусовые стимулы действуют на G-протеин сопряженные рецепторы способами, весьма схожими с теми, которые описаны в случае обоняния. Однако другие вкусовые стимулы, в основном соли и кислоты, действуют непосредственно на проводимость мембраны. Кроме того, вкусовые рецепторные клетки анатомически отличаются от обонятельных рецепторных нейронов.

Вкусовые рецепторные клетки

Вкусовые рецепторные являются волосковыми нейроэпителиальными клетками, распо-



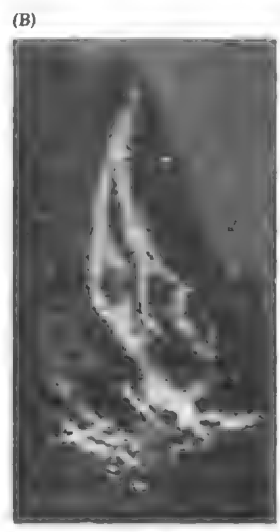


Рис. 17.16. Рецепторные вкусовые клетки во вкусовом сосочке. (A) Электронная микрофотография вкусового сосочка в языке крысы. (B) Изолированный вкусовой сосочек, в котором рецепторные клетки помечены антителами к гастдуцину.

Fig. 17.16. Taste Receptor Cells Are Found in Taste Buds within the lingual epithelium. (A) Transmission electron micrograph of a taste bud in rat tongue. Individual taste receptor cells have microvilli that project into the taste pore to sample the saliva. (B) An individual taste bud dissected from rat tongue. The taste receptor cells (grey) are labeled with an antibody to gustducin, a G protein involved in taste transduction. (A kindly provided by R. Yang and J. Kinnamon; B kindly provided by I. Wanner and S. D. Roper.)

ложенными во вкусовых сосочках на поверхности языка (рис. 17.16). Как и обонятельные рецепторы, вкусовые клетки регенерируют на протяжении жизни. В отличие от обонятельных рецепторов, вкусовые клетки не имеют аксонов, но формируют химические синапсы с афферентными нейронами во вкусовых сосочках. Микроворсинки направляются от апикального полюса вкусовой клетки в открытую пору вкусового сосочка, где они вступают в контакт с вкусовыми стимулами, растворенными в слюне на поверхности языка.

Вкусовые стимулы обычно подразделяются на пять категорий: соленые, кислые, горькие, сладкие и «умами» — последняя категория обозначается японским словом, обозначающим вкус глутамата натрия, или, в более общем виде, вкус аминокислот. Это многообразие молекул вкусовых стимулов, от простых ионов до сложных карбогидратов и протеинов, сопряжено с широким многообразием механизмов трансдукции. Последние подразделяются на две обширные категории: прямое действие на ионные каналы и опосредованная рецепция вкусовых стимулов, вовлекающая систему вторичных посредников, включая G-протеины[92].

Соленый и кислый вкус

Общепринято, что соленый вкус передается непосредственным током натрия (или других одновалентных катионов) по каналам в апикальной мембране вкусовой клетки, открытым в состоянии покоя (рис. 17.17А)[93]. Натрий присутствует в более высокой концентрации в соленой пище (> 100 ммоль), чем в слюне, поэтому он просто диффундирует внутрь вкусовых клеток по своему электрохимическому градиенту. Возникающая в результате этого деполяризация приводит к выбросу нейромедиатора в химических синапсах, образованных вкусовыми клетками на отростках афферентных нейронов. Натриевые каналы вкусовых клеток не являются потенциалзависимыми, они сходны с эпителиальными натриевыми каналами, расположенными в коже и почках лягушки. Эти натриевые каналы блокируются диуретиком амилоридом (amiloride), и состоят из трех гомологичных субъединиц[94]. Субъединица α была обнаружена в эпителии языка[95].

Кислый вкус вызывается высокой концентрацией протонов в кислых продуктах, которые могут проникать во вкусовые клетки через амилорид-блокируемые каналы (рис. 17.17В)[96]. Другой механизм, ведущий к деполяризации, является следствием блокады K^+ каналов протонами[97]. Вкусовые клетки лягушки имеют катионные каналы, которые открываются протонами[98] и также вызывают деполяризацию. В дополнение к воздействию на реснички вкусовых клеток, соли и протоны могут проникать через вкусовые

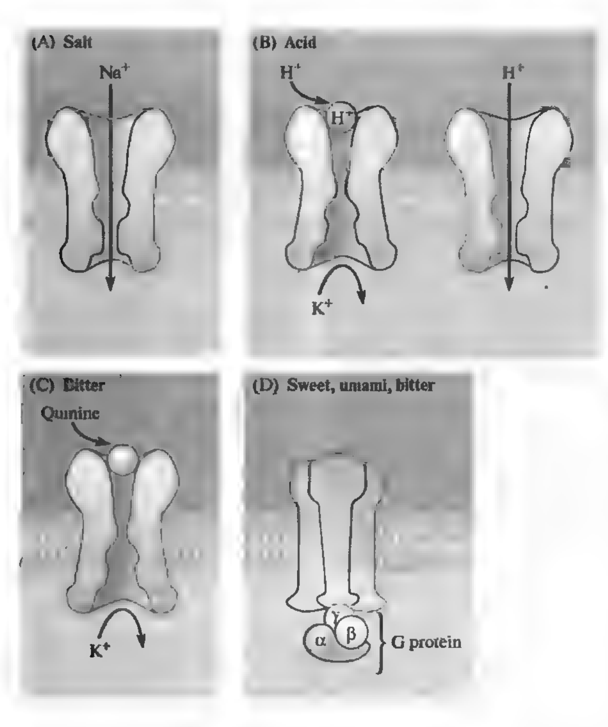


Рис. 17.17. Механизм вкусовой трансдукции. Ионный механизм действия рецепторов, чувствительных к (A) соленому, (B) кислому, (C) горькому и (D) сладкому (а также «умами» и горькому).

Fig. 17.17. Mechanisms of Taste Transduction. Tastant molecules range from protons (acids) to simple salts to complex organic compounds. This wide range of chemical stimuli is transduced by a multiplicity of mechanisms. Salts (A) and acids (B) can permeate ion channels in the sensitive ending or block normally open potassium channels. (C) Some bitter compounds block potassium channels to cause depolarization. (D) Sugars and amino acids (umami) interact with G protein–coupled receptors to initiate second messenger cascades. All these mechanisms lead eventually to depolarization, voltage-gated calcium influx, and increased release of transmitter onto associated afferent dendrites.

поры (околоклеточный путь) к базолатеральным участкам мембраны рецепторной клетки, действуя там на те же или другие ионные каналы (включая и такие, которые являются амилорид-нечувствительными)[99]. Этот механизм, вероятно, является общим принципом вкусового восприятия: для каждого отдельного класса вкусовых веществ имеется несколько параллельных путей трансдукции.

Сладкий и горький вкус

Сладкие вещества (сахар) и горькие вещества (часто это растительные алкалоиды, прототипом которых является хинин) обычно представляют собой крупные молекулы, которые связываются с макромолекулярными рецепторами с высокой степенью специфичности. За немногими исключениями, сладкие и горькие вещества активируют систему вторичных посредников путем взаимодействия с G-протеин сопряженными рецепторами (рис. 17.17C и D). Только немногие из этих макромолекулярных вкусовых рецепторов были идентифицированы (см. следующий раздел), но G-протеин, специфичный для вкусовой клетки, густдуцин (gustducin), был клонирован и оказался гомологичен трансдуцину — фоторецепторному G-протеину[100]. Во вкусовых клетках обнаружен широкий спектр молекул, участвующих в последующих каскадах, включая цАМФ фосфодиестеразу, фосфолипазу C и другие компоненты путей, ведущих к синтезу циклических нуклеотидов и IP_3[92]. G-протеиновая гипотеза горького и сладкого вкуса подтверждается наблюдением, что трансгенные мыши, лишенные гена густдуцина, могли ощущать соленое и кислое, но не горькое и сладкое[101].

Молекулярные рецепторы для глутамата и чили

Свободный глутамат встречается во многих продуктах, включая мясо, сыр и некоторые овощи, и используется как пищевая приправа в форме глутамата натрия (ГН). Вкус глутамата передается G-протеин-сопряженным метаботропным глутаматным рецептором, который специфически экспрессируется во вкусовых сосочках, но не в окружающем нечувствительном языковом эпителии[102, 103].

Методом условной вкусовой аверсии было показано, что как ГН, так и специфичный агонист mGluR4 рецепторов (метаботропных глутаматных рецепторов 4-го типа) L-AP4, вызывают сходные вкусовые ощущения у крыс.

В таких исследованиях используют тесную связь между вкусом продукта и вызванной им тошнотой, чтобы определить, подобны ли вкусовые ощущения. Крысы, у которых после вкусовых ощущений, обусловленных ГН, вызывали тошноту (внутрибрюшинной инъекцией LiCl), затем боялись вкуса mGluR4-специфичного агониста L-AP4 (а также ГН), но не специфичных агонистов других глутаматных рецепторов.

Таким образом, молекулярный рецептор глутамата является специфическим вкусовым рецептором на языке. «Жгучий» вкус перцев чили представляет другой пример многофункциональности молекулярных рецепторов. Жгучие перцы чили не воспринимаются самими вкусовыми клетками, но скорее болевыми волокнами в языке, которые активируются капсаициновыми соединениями. Рецептор капсаицина клонирован, и доказано, что это кальций-селективный катионный канал[104]. Рецептор «жгучести» (обозначенный VR1, потому что он был первым из членов рецепторного семейства ваниллоидов) образован волокнами мелкого размера (С-волокна) от клеток спинальных ганглиев, сигнализирующих о боли. Таким образом, природа снабдила перцы чили химической нацеленностью на данный рецептор, возможно, чтобы отпугивать травоядных путем активации болевых волокон, — что оказалось не столь успешной стратегией в случае с человеком, с его пристрастием к острой пище.

§ 5. Трансдукция ноцицептивных и температурных стимулов

При температуре около 33° С у нас обычно не возникает температурных ощущений. Когда температура кожи поднимается или опускается выше или ниже этой нейтральной точки, это вызывает ощущение тепла или холода. Существуют два вида температурных рецепторов в коже: один сигнализирует о тепле, другой — о холоде. Вы можете легко продемонстрировать это на тыльной стороне кисти руки: если касаться кожи в различных местах каким-либо предметом, имеющим комнатную температуру (например, острием обычного карандаша), то в некоторых точках это вызовет ощущение холода. Вне этих точек ощущается только прикосновение. Чтобы обнаружить другие точки, пространственно отличающиеся от холодовых, где ощущается тепло, используется теплый металлический пробник. Таких мест меньше, и их нужно долго искать. Кожные температурные афференты отличаются от тех, которые сигнализируют об экстремальных температурных воздействиях, вызывающих болевые ощущения.

Активация и сенситизация ноцицепторов

Ноцицепция (восприятие стимулов боли и повреждения) возникает из сочетания прямых и непрямых воздействий на периферические сенсоры. Болезненное нагревание (выше 43° С) вызывает открывание неспецифических катионных каналов в окончаниях С-волокон[105, 106]. Ионы кальция и натрия входят в клетку и деполяризируют ее, вызывая генерацию потенциала действия. Кислоты могут также напрямую открывать катионные каналы. Кислотно-чувствительные ионные каналы (ASIC) были клонированы из ноцицептивных нейронов[107]. Механическое повреждение кожи может привести непосредственно к деполяризации ноцицепторов[108]. Когда клетки, содержащие капсаициновые рецепторы VR1, быстро нагреваются, то открывание этих рецепторов приводит к возникновению болезненного теплового ощущения. Продолжительное воздействие капсаицина вызывает постепенное накопление кальция и смерть клетки. Парадоксально, но капсаицин используется и как долговременный анальгетик, поскольку, убивая С-волоконные афференты, он облегчает тем самым хронические боли[109].

Помимо болевых стимулов, таких как тепло или кислота, которые могут воздействовать непосредственно на ноцицепторы, поврежденные клетки выделяют химические активаторы, такие как аденозинтрифосфат (АТФ). Одна из субъединиц АТФ-рецептора ($P2X_3$) специфична для клеток ганглиев задних корешков, образующих С-волокна, и может объединяться с другими субъединицами, вызывая медленно десенситизирующееся возбуждение ноцицепторов аденозинтрифосфатом[110)–112]. Клеточное повреждение также ведет к выделению цитоплазматических протеаз, которые затем расщепляют белки плазмы крови. Таким образом, из кининогена, распространенного неактивного предшественника, производится пептид

брадикинин, состоящий из 9 аминокислотных остатков. Брадикинин является сильным активатором окончаний С-волокон, вызывающим в них входящий ток и генерацию потенциалов действия. Рецептор брадикинина может действовать через повышение уровня вторичного посредника IP_3[113].

Брадикинин и другие химические вещества в поврежденной коже также повышают чувствительность ноцицептивных окончаний. Активируемые теплом катионные токи больше по величине и возникают при более низких температурах, как результат активации брадикинином протеинкиназы С[30]. Другими медиаторами воспалительного процесса являются простагландины, серотонин, гистамин и субстанция Р. Простагландин Е2 и серотонин повышают уровень цАМФ, увеличивая тем самым амплитуду и потенциалочувствительность натриевого тока в ноцицепторах[114]. Повреждение тканей также повышает экспрессию α-адренергических рецепторов в нейронах ганглиев задних корешков — это еще один из механизмов увеличения возбудимости[115]. Активированные болевые волокна выделяют вещество Р не только из своих синапсов внутри спинного мозга (глава 14), но также из своих терминалей в коже. На периферии вещество Р может увеличивать возбудимость С-волокон, блокируя K^+ каналы[116]. Процесс сенситизации сопровождается локальной вазодилятацией и опуханием. Поврежденная область становится «гиперальгезивной», т. е. приобретает пониженный болевой порог.

Выводы

- Каждый тип сенсорных рецепторов отвечает предпочтительно на один тип стимула — адекватный стимул.
- Короткие и длинные рецепторы различаются морфологически и функционально. Короткие рецепторы кодируют интенсивность стимула непосредственно в амплитуде рецепторного потенциала. Длинные рецепторы, помимо этого, преобразуют амплитуду рецепторного потенциала в частотный код импульсной активности.
- Ответ многих рецепторов нелинейно зависит от интенсивности стимула. Это обеспечивает некоторым типам рецепторов широкий динамический диапазон.
- Наиболее чувствительные рецепторы адаптируются в той или иной степени во время длительного стимула. Адаптация обусловлена как механическими, так и электрическими факторами. Некоторые рецепторы за счет очень быстрой адаптации «настраиваются» на быстро изменяющиеся стимулы, такие как вибрация.
- Механочувствительные волосковые клетки внутреннего уха непосредственно преобразуют движение в открытие ионных каналов посредством физической связи. Концевая связь, которая соединяет соседние стереоцилии, растягивается посредством отклонения волоскового пучка, открывая таким образом ионный канал.
- Вход кальция через неселективный канал механотрансдукции волосковых клеток приводит к адаптации и закрыванию канала.
- Обонятельные нейроны используют G-протеин-сопряженные мембранные рецепторы, что ведет к открыванию цАМФ-управляемых катионных каналов в плазматической мембране. Каждый представитель обширного семейства обонятельных рецепторных белков экспрессируется небольшим количеством клеток. Все нейроны, экспрессирующие конкретный рецепторный белок, проецируются в единую гломерулу обонятельной луковицы.
- Аминокислоты, сахара и горькие соединения связаны с G-протеин-сопряженными рецепторами во вкусовых сенсорных клетках. Соль и протоны (кислые соединения) воздействуют непосредственно на ионные каналы, генерируя рецепторные потенциалы во вкусовых клетках.
- Болевые и температурные ощущения передаются разнообразными химическими посредниками. Прямое механическое повреждение или чрезмерное нагревание вызывает потенциал действия в болевых волокнах. Соединения, выделяемые из поврежденных тканей, такие как брадикинин, сенситизируют нонцицептивные окончания.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Bell, J., Bolanowski, S., and Holmes, M. H. 1994. The structure and function of Pacinian corpuscles: A review. *Prog. Neurobiol.* 42: 79–128.
- Bialek, W. 1987. Physical limits to sensation and perception. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16: 455–478.
- Garcia-Anoveros, J., and Corey, D. P. 1997. The molecules of mechanosensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 567–594.
- Hudspeth, A. J., and Gillespie, P. G. 1994. Pulling springs to tune transduction: Adaptation by hair cells. *Neuron* 12: 1–9.
- Hunt, C. C. 1990. Mammalian muscle spindle: Peripheral mechanisms. *Physiol. Rev.* 70: 643–663.
- Kinnamon, S. C., and Margolskee, R. F. 1996. Mechanisms of taste transduction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 506–513.
- Lindemann, B. 1996. Taste reception. *Physiol. Rev.* 76: 718–766.
- Mombaerts, P. 1999. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 487–509.
- Perl, E. R. 1999. Causalgia, pathological pain, and adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7664–7667.

Статьи

- Assad, J. A., Shepherd, G. M. G., and Corey, D. P. 1991. Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron* 7: 985–994.
- Buck, L., and Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175–187.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., and Julius D. 1997. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816–824.
- Cesare, P., and McNaughton, P. A. 1996. A novel heat-activated current in nociceptive neurones and its sensitization by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15435–15439.
- Chaudhari, N., Landin, A. M., and Roper, S. D. 2000. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nature Neurosci.* 3: 113–119.
- Cook, S. P., Vulchanova, L., Hargreaves, K. M., Elde, R., and McCleskey, E. W. 1997. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* 387: 505–508.
- Crawford, A. C., and Fettiplace, R. 1985. The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells. *J. Physiol.* 364: 359–379.
- Crawford, A. C., Evans, M. G., and Fettiplace, R. 1991. The actions of calcium on the mechanoelectrical transducer current of turtle hair cells. *J. Physiol.* 434: 369–398.
- Dhallan, R. S., Yau, K. W., Schrader, K. A., and Reed, R. R. 1990. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347: 184–187.
- Eyzaguirre, C., and Kuffler, S. W. 1955. Processes of excitation in the dendrites and soma of single isolated sensory nerve cells of the lobster and crayfish. *J. Gen. Physiol.* 39: 87–119.
- Gillespie, P. G., Wagner, M. C., and Hudspeth, A. J. 1993. Identification of a 120 kd hair-bundle myosin located near stereociliary tips. *Neuron* 11: 581–594.
- Hudspeth, A. J., and Corey, D. P. 1977. Sensitivity, polarity and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2407–2411.
- Loewenstein, W. R., and Mendelson, M. 1965. Components of adaptation in a Pacinian corpuscle. *J. Physiol.* 177: 377–397.
- Nakamura, T., and Gold, G. H. 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 532: 442–444.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., and Buck, L. B. 1993. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73: 597–609.
- Ricci A. J., Wu, Y-C., and Fettiplace R. 1998. The endogenous calcium buffer and the time course of transducer adaptation in the auditory hair cells. *J. Neurosd.* 18: 8261–8277.
- Shotwell, S. L., Jacobs, R., and Hudspeth A. J. 1981. Directional sensitivity of individual vertebrate hair cells to controlled deflection of their hair bundles. *Annu. N. Y. Acad.* Sci. 374: 1–10.
- Vassar, R., Ngai, J., and Axel R. 1993. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74: 309–318.

Цитированная литература

1. Bialek, W. 1987. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16: 455–478.
2. Kalmidjn, A. J. 1982. *Science* 218: 916–918.
3. Heiligenberg, W. 1989. *J. Exp. Biol.* 146: 255–275.

4. Roberts, A., and Bush, B. M. H. 1971. *J. Exp. Biol.* 54: 515–524.
5. Blackshaw, S. E., and Thompson, S. W. 1988. *J. Physiol.* 396: 121–137.
6. Hudspeth, A. J., Poo, M. M., and Stuart, A. E. 1977. *J. Physiol.* 272: 25–43.
7. Adrian, E. D., and Zotterman, Y. 1926. *J. Physiol.* 61: 151–171.
8. Katz, B. 1950. *J. Physiol.* 111: 261–282.
9. Boring, E. G. 1942. *Sensation and Perception in the History of Experimental Psychology.* Appleton-Century, New York.
10. Eyzaguirre, C., and Kuffler, S. W. 1955. *J. Gen. Physiol.* 39: 87–119.
11. Matthews, B. H. C. 1931. *J. Physiol.* 71: 64–110.
12. Matthews, B. H. C. 1931. *J. Physiol.* 72: 153–174.
13. Matthews, B. H. C. 1933. *J. Physiol.* 78: 1–53.
14. Hunt, C. C. 1990. *Physiol. Rev.* 70: 643–663.
15. Walro, J. M., and Kucera, J. 1999. *Trends Neurosci.* 22: 180–184.
16. Matthews, P. B. C. 1981. *J. Physiol.* 320: 1–30.
17. Fukami, Y., and Hunt, C. C. 1977. *J. Neurophysiol.* 40: 1121–1131.
18. Nakajima, S., and Takahashi, K. 1966. *J. Physiol.* 187: 105–127.
19. Nakajima, S., and Onodera, K. 1969. *J. Physiol.* 200: 187–204.
20. Sokolove, P. G., and Cooke, I. M. 1971. *J. Gen. Physiol.* 57: 125–163.
21. Erxleben, C. F. 1993. *Neuroreport* 4: 616–618.
22. Bell, J., Bolanowski, S., and Holmes, M. H. 1994. *Prog. Neurobiol.* 42: 79–128.
23. Quilliam, T. A., and Armstrong, J. 1963. *Endeavour* 22: 55–60.
24. McIntyre, A. K. 1980. *Trends Neurosci.* 3: 202–205.
25. Loewenstein, W. R., and Mendelson, M. 1965. *J. Physiol.* 177: 377–397.
26. Takahashi, M., et al. 1997. *J. Vasc. Res.* 34: 212–219.
27. Ingber, D. E. 1997. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 575–599.
28. Garcia-Anoveros, J., and Corey, D. P. 1997. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 567–594.
29. Brown, H. M., Ottoson, D., and Rydqvist, B. 1978. *J. Physiol.* 284: 155–179.
30. Rydqvist, B., and Purali, N. 1993. *J. Physiol.* 469: 193–211.
31. Edwards, C., et al. 1981. *Neuroscience* 6: 1455–1460.
32. Nakajima, S., and Onodera, K. 1969. *J. Physiol.* 200: 161–185.
33. Lin, J. H., and Rydqvist, B. 1999. *Acta Physiol. Scand.* 166: 65–74.
34. Hunt, C. C., Wilkerson, R. S., and Fukami, Y. 1978. *J. Gen. Physiol.* 71: 683–698.
35. Guharay, R., and Sachs, F. 1984. *J. Physiol.* 352: 685–701.
36. Sachs, F. 1988. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 16: 141–169.
37. Erxleben, C. 1989. *J. Gen. Physiol.* 94: 1071–1083.
38. Flock, A., Flock, B., and Murray, E. 1977. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 83: 85–91.
39. Loewenstein, O., and Wersall, J. 1959. *Nature* 184: 1807–1808.
40. Flock, A. 1965. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 30: 133–145.
41 Crawford, A. C., and Fettiplace, R. 1985. *J. Physiol.* 364: 359–379.
42. Hudspeth, A. J., and Corey, D. P. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2407–2411.
43. Hudspeth, A. J., and Jacobs, R. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1506–1509.
44. Corey, D. P., and Hudspeth, A. J. 1979. *Nature* 281: 675–677.
45. Shotwell, S. L., Jacobs, R., and Hudspeth, A. J. 1981. *Annu. N. Y. Acad. Sci.* 374: 1–10.
46. Pickles, J. O., Comis, S. D., and Osborne, M. P. 1984. *Hear. Res.* 15: 103–112.
47. Crawford, A. C., Evans, M. G., and Fettiplace, R. 1991. *J. Physiol.* 434: 369–398.
48. Assad, J. A., Shepherd, G. M. G., and Corey, D. P. 1991. *Neuron* 7: 985–994.
49. Hudspeth, A. J. 1982. *J. Neurosci.* 2: 1–10.
50. Jaramillo, F., and Hudspeth, A. J. 1991. *Neuron* 7: 409–420.
51. Lumpkin, E. A., and Hudspeth, A. J. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10297–10301.
52. Corey, D. P., and Hudspeth, A. J. 1983. *J. Neurosci.* 3: 962–976.
53. Crawford, A. C., Evans, M. G., and Fettiplace, R. 1989. *J. Physiol.* 419: 405–434.
54. Howard, J., and Hudspeth, A. J. 1988. *Neuron* 1: 189–199.
55. Ohmori, H. 1985. *J. Physiol.* 359: 189–217.
56. Denk, W., et al. 1995. *Neuron* 15: 1311–1321.
57. Ricci, A. J., Wu, Y-C., and Fettiplace, R. 1998. *J. Neurosci.* 18: 8261–8277.
58. Hacohen, N., et al. 1989. *J. Neurosci.* 9: 3988–3997.
59. Hudspeth, A. J., and Gillespie, P. G. 1994. *Neuron* 12: 1–9.
60. Solc, C. K., et al. 1994. *Auditory Neurosci.* 1: 63–75.
61. Gillespie, P. G., Wagner, M. C., and Hudspeth, J. A. 1993. *Neuron* 11: 581–594.
62. Ricci, A. J., and Fettiplace, R. 1997. *J. Physiol.* 501: 111–124.
63. Kemp, D. T. 1978. *J. Acoust. Soc. Am.* 64: 1386–1391.
64. Lonsbury-Martin, B. L., et al. 1995. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 112: 50–63.

65. Stern, K., and McClintock, M. K. 1998. *Nature* 392: 177–179.
66. Kelly, D. R. 1996. *Chem. Biol.* 8: 595–602.
67. Bingman, V. P., and Benvenuti, S. 1996. *J. Exp. Zool.* 276: 186–192.
68. Pevsner, J., et al. 1988. *Science* 241: 336–339.
69. Farbman, A. I. 1994. *Semin. Cell. Biol.* 5: 3–10.
70. Adrian, E. D. 1953. *Acta Physiol. Scand.* 29: 5–14.
71. Ottoson, D. 1956. *Acta Physiol. Scand.* 35 (Suppl. 122): 1–83.
72. Maue, R. A., and Dionne, V. E. 1987. *J. Gen. Physiol.* 90: 95–125.
73. Firestein, S., Shepherd, G. M., and Werblin, F. 1990. *J. Physiol.* 430: 135–158.
74. Nakamura, T., and Gold, G. H. 1987. *Nature* 532: 442–444.
75. Kleene, S. J., and Gesteland, R. C. 1991. *J. Neurosci.* 11: 3624–3629.
76. Kurahashi, T., and Yau, K. Y. 1993. *Nature* 363: 71–74.
77. Dhallan, R. S., et al. 1990. *Nature* 347: 184–187.
78. Menini, A., Picco, C., and Firestein, S. 1995. *Nature* 373: 435–437.
79. Buck, L., and Axel R. 1991. *Cell* 65: 175–187.
80. Jones, D. T., and Reed, R. R. 1989. *Science* 244: 790–796.
81. Pace, U., et al. 1985. *Nature* 316: 255–258.
82. Bakalyar, H. A., and Reed, R. R. 1990. *Science* 250: 1403–1406.
83. Breer, H., Boekhoff, I., and Tareilus, E. 1990. *Nature* 345: 65–68.
84. Boekhoeff, I., et al. 1990. *EMBO J.* 9: 2453–2458.
85. Restrepo, D., et al. 1990. *Science* 249: 1166.
86. Ache, B. W., and Zhainazarov, A. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 461–466.
87. Brunet, L. J., Gold, G. H., and Ngai, J. 1996. *Neuron* 17: 681–693.
88. Sicard, G., and Holley, A. 1984. *Brain Res.* 292: 283–296.
89. Ressler, K. J., Sullivan, S. L., and Buck, L. B. 1993. *Cell* 73: 597–609.
90. Vassar, R., Ngai, J., and Axel, R. 1993. *Cell* 74: 309–318.
91. Herrada, G., and Dulac, C. 1997. *Cell* 90: 763–773.
92. Kinnamon, S. C., and Margolskee, R. F. 1996. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 506–513.
93. Avenet, P., and Lindemann, B. 1991. *J. Membr. Biol.* 124: 33–41.
94. Canessa, C. M., et al. 1994. *Nature* 367: 463–467.
95. Li, X.-J., Blackshaw, S., and Snyder, S. H. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1814–1818.
96. Gilbertson, T. A., Roper, S. D., and Kinnamon, S. C. 1993. *Neuron* 10: 931–942.
97. Kinnamon, S. C., Dionne, V. E., and Beam, K. G. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7023–7027.
98. Okada, Y., Miyamoto, T., and Sato, T. 1994. *J. Exp. Biol.* 187: 19–32.
99. Lindemann, B. 1996. *Physiol. Rev.* 76: 718–766.
100. McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J., and Margolskee, R. F. 1992. *Nature* 357: 563–569.
101. Wong, G. T., Gannon, K. S., and Margolskee, R. F. 1996. *Nature* 381: 796–800.
102. Chaudhari, N., et al. 1996. *J. Neurosci.* 16: 3817–3826.
103. Chaudhari, N., Landin, A. M., and Roper, S. D. 2000. *Nature Neurosci.* 3: 113–119.
104. Caterina, M. J., et al. 1997. *Nature* 389: 816–824.
105. Bevan, S., and Yeats, J. 1991. *J. Physiol.* 433: 145–161.
106. Cesare, P., and McNaughton, P. A. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15435–15439.
107. Waldmann, R., et al. 1997. *Nature* 386: 173–177.
108. Burgess, P. R., and Perl, E. R. 1967. *J. Physiol.* 190: 541–562.
109. Szallasi, A., and Blumberg, P. M. 1996. *Pain* 68: 195–208.
110. Chen, C. C., et al. 1995. *Nature* 377: 428–431.
111. Lewis, C., et al. 1995. *Nature* 377: 432–435.
112. Cook, S. P., et al. 1997. *Nature* 387: 505–508.
113. Burgess, G. M., et al. 1989. *J. Neurosci.* 9: 3314–3325.
114. Gold, M. S., et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1108–1112.
115. Perl, E. R. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7664–7667.
116. Adams, P. R., Brown, D. A., and Jones, S. W. 1983. *Br. J. Pharmacol.* 79: 330–333.

Глава 18

Обработка соматосенсорных и слуховых сигналов

В данной главе мы рассматриваем, как две сенсорные системы, соматосенсорная и слуховая, генерируют сигналы и анализируют соматическую и звуковую информацию. Обе системы зависят, в первую очередь, от сенсорных рецепторов, которые реагируют на механические стимулы, возникающие в результате непосредственной деформации от осязания, или движения конечностей, или смещений, вызванных звуковыми волнами. Центральная нервная система снабжается информацией о месте прикосновения на поверхности тела благодаря сигналам, возникающим от механорецепторных нейронов со специфическими модальностями на коже и в подкожных тканях. Рецептивное поле соматосенсорного нейрона в ЦНС определяется как область периферии, в которой адекватный стимул приводит к изменению активности этого нейрона. Рецептивное поле может быть очень мало, как на кончиках пальцев, или обширно, как в средних участках спины. Концепция рецептивного поля для слуховых сенсорных нейронов более абстрактна. Первичные сенсорные афференты кодируют частотный состав звука с чрезвычайной чувствительностью и избирательностью, но не определяют его пространственной локализации. Скорее, карта звукового пространства выводится центральными нейронами из анализа временного хода и интенсивности входных сигналов, поступающих через оба уха.

Эти различия между двумя системами влияют на организацию проводящих путей и обработку сигналов в ЦНС. Соматосенсорная информация передается от периферических афферентов через нейроны второго порядка в ядрах задних столбов спинного мозга на нейроны вентробазального комплекса таламуса без существенных изменений. Таким образом, нейроны в первичной соматосенсорной коре, принимающие входные сигналы таламуса, имеют такие характеристики ответов, которые тесно связаны с характеристиками сенсорных клеток, напрямую иннервирующих кожу или суставы. Соматосенсорная кора соматотопически картирована. Клетки первичной соматосенсорной коры, объединенные в составе вертикальной колонки, имеют близкую локализацию рецептивных полей и сходный набор модальностей стимула. Вторичные (и ассоциативные) соматосенсорные области также соматотопически картированы, однако они содержат нейроны с более сложными характеристиками стимула, чем характеристики клеток первичной соматосенсорной коры, что предполагает иерархический способ извлечения признаков. «Значение» стимула в соматосенсорной системе зависит, в основном, от его положения на поверхности тела.

Значение звука определяется анализом его спектральных (частотных) и временных характеристик. Частотная избирательность слуховых волосковых клеток определяется их механической и электрической настройкой. Эпителий волосковых клеток организован тонотопически. Афферентные волокна избирательно иннервируют волосковые клетки, и, таким образом, характеризуются своей оптимальной частотой звука, на которую они реагируют лучше всего. Эфферентная отрицательная обратная связь на волосковых клетках улитки уменьшает их чувствительность и частотную избирательность. Афферентные волокна улитки образуют синаптические контакты в ядрах ствола мозга. Нейроны второго порядка проецируются в комплекс верхних олив или идут в составе путей, восходящих через нижние бугры четверохолмия в таламические ядра медиального коленчатого тела. Нейроны в первичной слуховой коре получают вход от обоих ушей и кодируют свойства звука более сложные, чем те, которые были распознаны на периферии. Локализация звука определяется нейронной переработкой, включающей сравнение входов от обоих ушей. Соответственно, центральный слуховой путь включает в себя сложный набор синаптических переключений и обратных связей, в которых происходит бинауральное сравнение, либо определение других аспектов временной организации и частотного состава стимула.

Наше знание о мире зависит от преобразования энергии окружающей среды в нейрональные сигналы. Как определяется значение электрических сигналов? Четыре принципа организации являются важными для сенсорной обработки. Первый из них — это **сохранение отношений ближайшего соседства** в организации нервной системы, от рецептивной поверхности до коры. Проистекающая из этого принципа соматотопия (в слуховой системе — тонотопия) лежит в основе таких синаптических процессов, как латеральное торможение, за счет которого более четко выявляются центральные области рецептивных полей. Второй принцип основан на том факте, что нервная система уделяет особое внимание сигналам, изменяющимся во времени. Таким образом, **временная**, или **частотная**, **настройка** является основным фактором для сенсорного анализа. Третий принцип — это принцип **параллельной обработки** различных функциональных аспектов стимула. Четвертый — это концепция **иерархической**, или **последовательной**, обработки, посредством которой более высокие уровни сенсорных путей объединяют входы от более низких уровней, с тем чтобы получить новые, более сложные сенсорные конструкции. В этой главе исследуются соматосенсорная и слуховая системы. В обеих системах могут быть прослежены сходные принципы нейрональной организации. В то же время, различающиеся функциональные потребности соматического восприятия и слуха дают наглядные примеры разнообразия сенсорных механизмов.

§ 1. Соматосенсорная система: тактильное распознавание

Когда вы проводите кончиками пальцев по одежде или касаетесь ими острия карандаша, вы активируете осязательные рецепторы, которые сообщают вам о текстуре объекта или о локализации точки стимуляции. Если вы с силой сжимаете ручку молотка или теннисной ракетки, вы активируете рецепторы, которые находятся более глубоко в коже и реагируют на силу давления и растяжения, возникающие в результате такого контакта. Очевидно, что в этих различных ситуациях возникают и совершенно различные ощущения. Какие типы рецепторов снабжают нас столь разнообразными ощущениями, и как они организованы? Как мы различаем грубое от мягкого, яйцо от ручной гранаты? Осязание, чувство вибрации и проприоцепция (положение конечностей) обеспечиваются сигналами механорецепторов, проецирующимися через задние столбы спинного мозга в лемнисковую часть соматосенсорной системы, называемую так потому, что информация передается в таламус через специфическую структуру — **медиальный лемниск** (рис. 18.3А). В данном разделе мы описываем обработку этой системой кожной механорецепции. Роль рецепторов мышечного натяжения и суставных рецепторов, которые служат для проприоцепции, обсуждается в связи с функцией двигательного контроля (глава 22).

Организация рецепторов тонкого прикосновения

Лишенная волосяного покрова поверхность кисти руки и пальцев принадлежит к числу самых чувствительных частей тела, и иннервируется приблизительно 17 000 кожных рецепторов![1] Афферентные волокна от этих рецепторов изучались у обезьян и у людей с использованием методики, получившей название **микронейрографии**[2]. Вольфрамовые электроды вводятся в нерв и располагаются так, чтобы записывать импульсы от отдельного афферентного аксона во время механической стимуляции кожной поверхности. Область кожи, прикосновение к которой вызывает активность этого волокна, определяет его **рецептивное поле**. Рис. 18.1 показывает рецептивные поля кожного афферентного волокна одного типа. Область кожи около 3 мм в диаметре имеет очень низкий порог реагирования на прогиб. Границы этого рецептивного поля обозначены резким подъемом порога реагирования на прогиб (рис. 18.1В); за пределами этой области для возникновения разряда требуется гораздо более сильное прогибание кожи. В пределах рецептивного поля расположены локальные горячие точки, имеющие особенно высокую чувствительность (низкий порог). Они могут соответствовать положению отдельных рецепторных окончаний.

Среди тактильных афферентов гладкой (лишенной волос) кожи можно выделить быстро адаптирующиеся и медленно адаптирующиеся, имеющие малые или большие рецептивные поля[3]. Быстро адаптирующиеся рецепторы с малыми рецептивными полями оканчиваются в **тельцах Мейсиера** в поверхностных слоях кожи; медленно адапти-

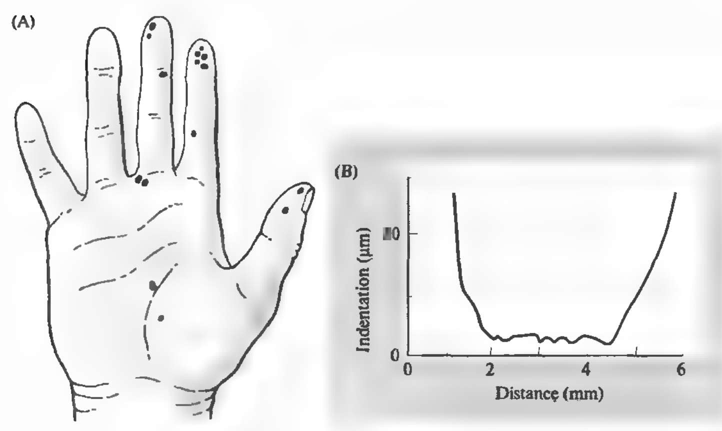


Рис. 18.1. Рецептивные поля быстро адаптирующихся тактильных рецепторов руки человека, картированные посредством регистрации разрядов в одиночных сенсорных волокнах. (А) Каждая точка на ладони и пальцах представляет рецептивное поле одного волокна. (В) Зависимость между величиной прогиба (в микрометрах), необходимой для возникновения ответа в волокне, и положением стимула в пределах рецептивного поля. В области максимальной чувствительности, радиусом не более 3 мм, для активации рецептора достаточно прогиба кожи всего на несколько микрометров.

Fig. 18.1. Receptive Fields of Rapidly Adapting Touch Receptors (probably Meissner's corpuscles) in a human hand. Fields were mapped by recording discharges from single fibers in a sensory nerve, using tungsten electrodes inserted through the skin. (A) Receptive fields consist of small, well-defined areas on the fingers and palm. Each dot represents the receptive field of one fiber. (B) Indentation (in micrometers) required to produce a response in one unit is plotted against location within a receptive field. The region of maximum sensitivity is about 3 mm in radius, within which indentations of only a few micrometers are sufficient to produce a response. Points of maximum sensitivity within the region presumably correspond to the position of individual endings of branches of the same afferent fiber. (After Johansson and Vallbo, 1983.)

рующиеся афференты с малыми рецептивными полями заканчиваются в **дисках Меркеля** (рис. 18.2). **Тельца Пачини** являются чувствительными к вибрации, быстро адаптирующимися рецепторами с большими рецепторными полями и находятся в более глубоких слоях кожи. Афферентные окончания в **тельцах Руффини** — медленно адаптирующиеся с большими рецепторными полями.

Медленно и быстро адаптирующиеся механорецепторы с малыми рецепторными полями расположены с наибольшей плотностью в кончиках пальцев (100/см^2), их плотность резко снижается уже в средних фалангах пальцев. Этот паттерн дифференциальной иннервации проявляется в том, что корковые представительства кончиков пальцев имеют большую площадь (как мы вскоре увидим), и объясняет предпочтительное использование пальцев для тактильного анализа предметов. Только губы и язык иннервированы более обильно.

Кодирование стимула

Как качества отдельных осязательных афферентных нейронов связаны с восприятием? Кодируются ли специфическими типами рецепторов такие качества, как твердость и мягкость, или эти ощущения выводятся из конвергенции нескольких осязательных модальностей? Человек ощущает вибрацию кожи на частоте ниже 40 Гц как дрожание, а стимуляцию при частоте от 80 до 300 Гц как зуд. Частотная зависимость этих ощущений коррелирует с настройкой групп быстро адаптирующихся рецепторов. Афференты телец Мейснера лучше всего реагируют на стимуляцию при 30 Гц; афференты телец Пачини оптимально реагируют на кожную вибрацию на частотах 250 Гц[4]. Таким образом, существует предположительная корреляция между свойствами ответа идентифицированных типов рецепторов и психофизически различимыми стимулами.

Однако пассивная вибрация кожи имеет ограниченное значение для познавательного процесса активного осязания, поэтому руки и пальцы быстро движутся по объекту, чтобы определить текстуру и очертания поверхности. Отведения активности от афферентных волокон у обезьян, обученных распознавать поверхностные очертания (выпуклые буквы), показывают, что важную роль в этом процессе играют медленно адаптирующиеся рецепторы с малыми рецепторными полями[5]. Этот класс рецепторов также вносит значительный вклад в восприятие шершавости объекта[6]. Быстро

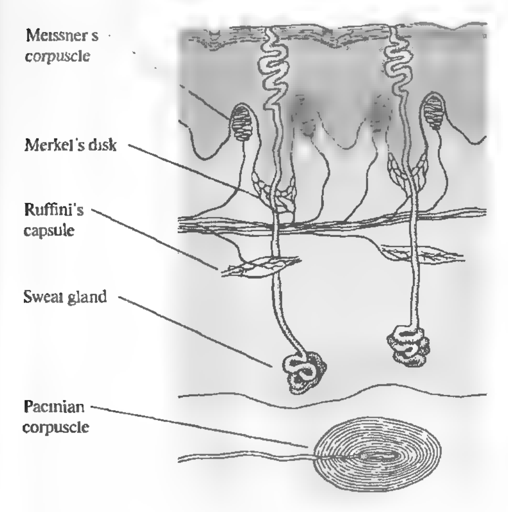


Рис. 18.2. Механорецепторы в коже. Показаны различные типы тактильных рецепторов, различающиеся по модальности, скорости адаптации и размерам рецептивного поля. Не показаны быстроадаптирующиеся рецепторы волосяных фолликул, отвечающие на движения волос, и свободные нервные окончания, передающие температурные, болевые ощущения и зуд.

Fig. 18.2. Mechanoreceptors in Skin. Rapidly adapting Meissner's corpuscles and slowly adapting Merkel's disks respond to skin indentation within small, well-defined fields. Ruffini's capsules are slowly adapting and have wider fields with poorly defined borders. Pacinian corpuscles are very rapidly adapting and sensitive to vibration over a wide area of skin. Not shown are rapidly adapting hair follicle receptors that respond to hair movement, and free nerve endings that mediate temperature, itch, and pain sensations. (After Johansson and Vallbo, 1983.)

адаптирующиеся рецепторы, чувствительные к вибрации, могут быть связаны с оценкой надежности захвата объекта, возможно, потому, что выскальзывание схваченных объектов вызывает вибрацию кожи[7)]. Медленно адаптирующиеся рецепторы, расположенные глубоко в коже, чувствительны к растяжению в определенном направлении, а также к другим стимулам, которые возникают при схватывании объектов.

Центральные проводящие пути

Определение методом микронейрографии порога стимуляции для различных типов афферентных нейронов можно сопоставить с психофизической реакцией человека. Существует четкое соотношение между чувствительностью периферических афферентов и восприятием уровня стимула, особенно при пороговой чувствительности. Замечательно, что единичного потенциала действия в одном из классов механорецептивных афферентов (быстро адаптирующихся) было достаточно, чтобы вызывать поддающиеся описанию ощущения, соответствующее прогибу кожной поверхности всего лишь на 10 мкм[1)]. Впечатляет не только чувствительность кончиков пальцев, но также и процесс передачи информации в мозг. Передача информации от внешнего раздражителя к осознанному восприятию происходит с чрезвычайно высокой надежностью. Всего несколько синаптических контактов существуют на этом пути к коре, и каждый действует с высоким фактором надежности, так что передача осуществляется без каких-либо искажений. То, что стимулы, воздействующие непосредственно на поверхность тела, имеют быстрый доступ к сознанию, представляет собой явное преимущество.

Рис. 18.3А показывает основные соматосенсорные пути передачи ощущений прикосновения, давления и вибрации в мозг. Периферические аксоны афферентных нейронов соединяются с телами клеток, расположенных в спинальных ганглиях. Центральные отростки афферентов от кожи, глубоких тканей, мышц и суставов входят в задние корешки, дают коллатерали для образования синапсов на спинальных нейронах и направляются в восходящем направлении в составе задних столбов, оканчиваясь на клетках второго порядка в клиновидном и тонком ядрах (которые называют **ядрами задних столбов**). Аксоны клеток второго порядка в ядрах задних столбов переходят на противоположную сторону и восходят в медиальный лемниск, оканчиваясь на клетках вентро-постеро-латерального (VPL) ядра таламуса. Пути от головы и шеи отличаются анатомически, но функционально аналогичны спинальным путям, оканчиваясь в вентро-постеро-медиальном (VPM) ядре таламуса. Клетки третьего порядка из VPL и VPM ядер таламуса проецируются в постцентральную извилину коры мозга — первичную соматосенсорную область.

Всего три синапса находятся между возбуждением окончаний первичных афферентов кожи и активацией нейронов коры. Принцип сохранения отношений ближайшего соседства сохраняется на всех уровнях этого пути, обеспечивая соматотопическую проекцию тела на уровне коры. Левая сторона тела картируется на правую соматосенсорную область коры, контралатеральная организация возни-

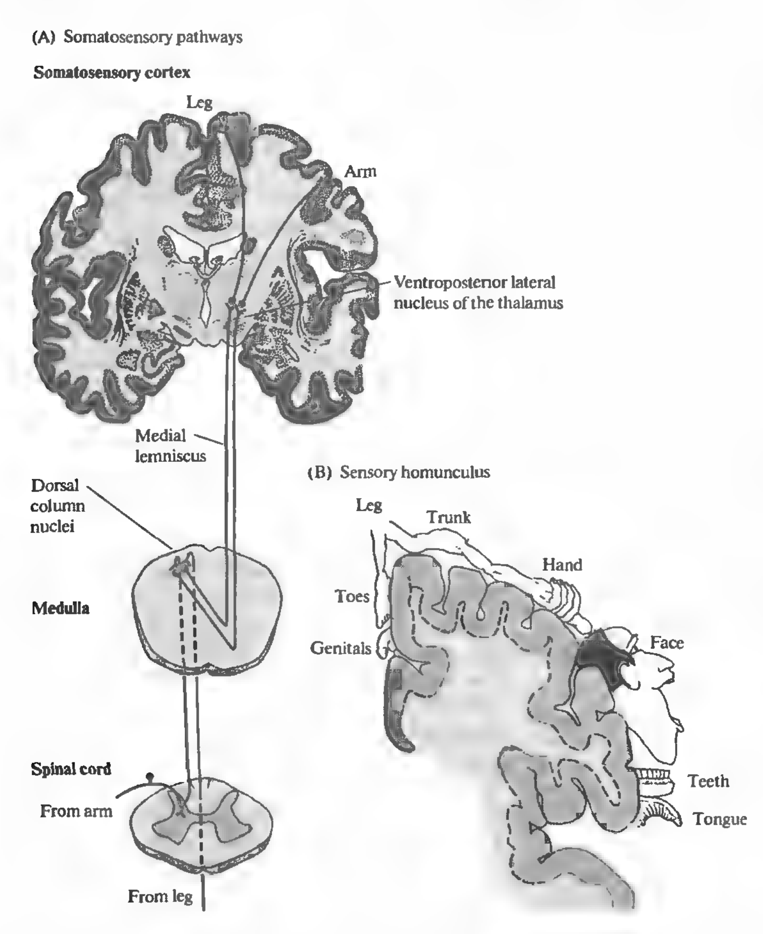


Рис. 18.3. Сенсорные проводящие пути, обеспечивающие тактильные ощущения. (А) Первичные афферентные волокна проходят ипсилатерально в составе задних столбов, переключаются в соответствующих ядрах продолговатого мозга на нейроны второго порядка, аксоны которых в составе медиального лемниска идут контралатерально, достигая вентропостериорных латеральных ядер таламуса, откуда нейроны третьего порядка проецируются на сенсорную область коры головного мозга. На всем пути поддерживается пространственная организация афферентных волокон, обеспечивающая инвертированную проекцию поверхности тела в соматосенсорной коре. (В) Соматотопическое представительство в сенсорной коре человека (сенсорный гомункулус) на поперечном срезе мозга.

Fig. 18.3. Sensory Pathway Subserving Touch Sensation. (A) A transverse section of the spinal cord and medulla, leading to a coronal section of the brain posterior to the central sulcus. Sensory fibers with cell bodies in the dorsal root ganglia enter the spinal cord, giving off collaterals that form synapses at segmental levels, and ascend to the medulla in the dorsal columns. At progressively ascending levels in the spinal cord, incoming fibers are added laterally, so that those from the leg are medial to those from the arm and a somatotopic order is maintained. In the medulla, second-order fibers cross the midline to ascend in the medial lemniscus to the ventroposterior lateral nucleus of the thalamus. Third-order fibers project to the sensory region of the cerebral cortex. (B) Somatotopic representation in the human sensory cortex (the sensory homunculus) on a coronal section of the brain. Densely innervated regions, such as the face, have a correspondingly large representation. (B after Penfield and Rasmussen, 1950.)

кает в результате перекрещивания аксонов, входящих в состав медиального лемниска.

Соматосенсорная кора

Первичная соматосенсорная кора (S_1) находится в извилине коры непосредственно позади центральной борозды. Серое вещество коры имеет в толщину несколько миллиметров и состоит из шести различимых слоев. От других участков первичной сенсорной коры S_1 отличается высокой плотностью гранулярных (звездчатых) клеток в слое 4, являющихся основным местом назначения таламических входов. Важная организационная особенность S_1 состоит в том, что соседние точки на поверхности коры представляют соседние участки поверхности тела. Ноги и туловище проецируются более медиально, затем представлены руки, а вслед за ними голова и язык (рис. 18.3В).

Стимуляция пре- и постцентральной извилин у пациентов, подвергающихся хирургической операции по удалению эпилептического очага, дала важные ранние сведе-

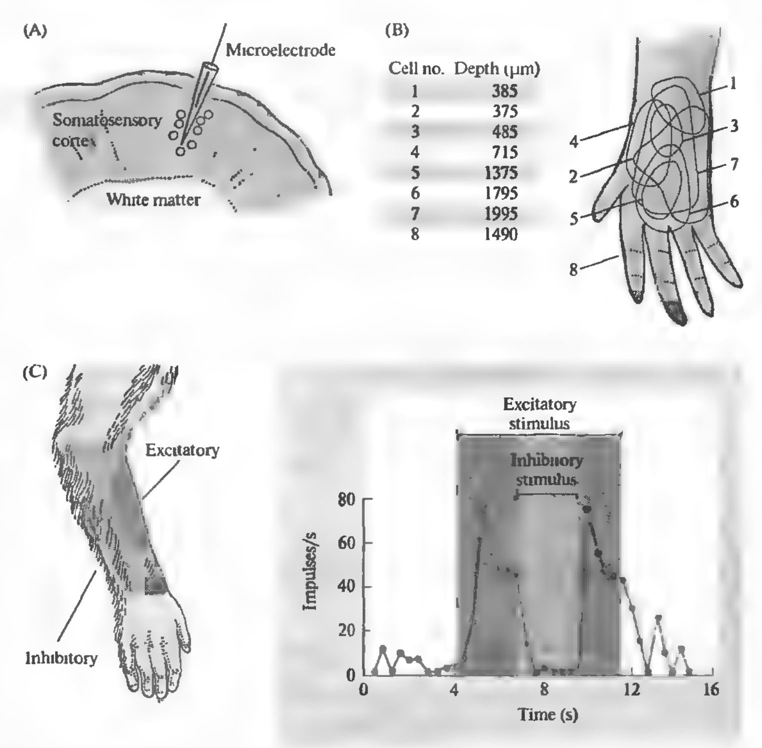


Рис. 18.4. Рецептивные поля нейронов в соматосенсорной коре обезьяны. (A) Электрод вводится в кору перпендикулярно ее поверхности. (B) Тактильные рецептивные поля клеток, расположенных по ходу электрода, расположены в одной области. (C) Рецептивное поле клетки из другого участка коры. Возбуждающая область на вентральной поверхности руки окружена тормозящей областью, которая подавляет ответ клетки.

Fig. 18.4. Receptive Fields of Neurons in monkey somatosensory cortex. (A) An electrode is inserted through the cortex at right angles to the surface. (B) Each cell encountered by the electrode successively deeper within the cortex responds to touch over roughly the same region of the hand. (C) Receptive field of a cell in another region of the cortex. The excitatory region on the ventral surface of the forearm is surrounded by an inhibitory region that suppresses the response of the cell. (B after Powell and Mountcastle, 1959; C after Mountcastle and Powell, 1959.)

ния для построения этой соматотопической карты[8]. Более подробные карты коры построены на основе исследований вызванных потенциалов (регистрация локального потенциала в ответ на стимуляцию кожи), осуществляемых на крысе, кролике, кошке и обезьяне[9]. Важным наблюдением было то, что пропорции кортикальной карты тела всегда искажались. У обезьян и людей участки S_1, картирующие руки, пальцы и губы, больше, чем те, которые связаны с туловищем или ногами. У других животных преобладают различные регионы тела: усы у крысы или мыши (рис. 18.7), лапа у енота[10] или нос у утконоса[11].

Искажения соматотопической карты обусловлены более высокой плотностью иннервации тактильными рецепторами периферических зон в области кончиков пальцев, губ и языка. В то же время было показано, что корковые представительства не остаются неизменными, но могут видоизменяться из-за повреждений, которые модифицируют сенсорный вход в кору, или даже за счет дифференциальной стимуляции периферии. Например, обнаружено, что корковое представительство левой руки у музыкантов, играющих на струнных инструментах (например, на скрипке), больше, чем у контрольной группы людей[12]. Подобные наблюдения подразумевают, что таламические входы в кору пластичны, и что объем или эффективность синаптических полей, формируемых ими, может меняться в результате деятельности[13].

Свойства ответов корковых нейронов

Каким образом информация обрабатывается в соматосенсорной коре? Ранее мы описали свойства кожных механорецепторов посредством регистрации их потенциалов действия во время стимуляции кожи. Подобные же эксперименты проводились, чтобы определить, как корковые нейроны реагируют на стимуляцию кожи. Металлические или стеклянные микроэлектроды, введенные в мозг с помощью микроманипуляторов, использовались для записи потенциалов действия отдельных корковых нейронов, так называе-

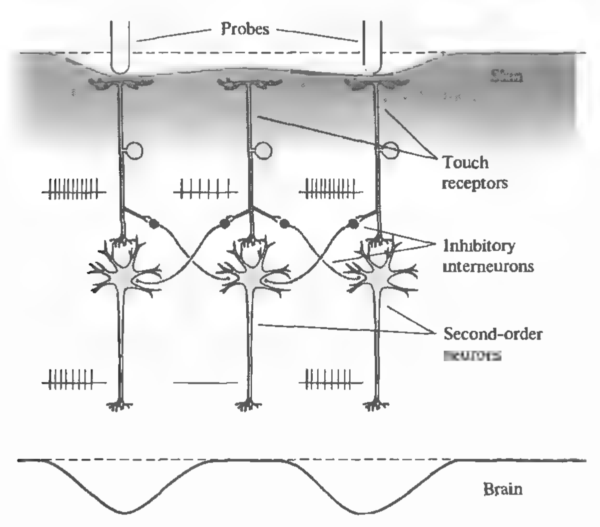


Рис. 18.5. Латеральное торможение. Два пробника прогибают кожу, активируя три тактильных рецептора, один из которых расположен между точками прикосновения. Паттерны активности в первичных и вторичных нейронах значительно различаются за счет влияния тормозных интернейронов, вызывающих латеральное торможение. За счет этого профиль стимула в мозге, показанный нижней линией, значительно чище, чем в первичных афферентах.

Fig. 18.5. Lateral Inhibition. Two probes deflect the skin and activate three touch receptors, one of which lies between the points of contact. All three receptors excite second-order neurons, as well as inhibitory interneurons in a central nucleus. The inhibitory interneurons project to neighboring pathways and fire in proportion to the input they receive. Thus, the second-order neurons have more highly differentiated patterns of activity than do the primary afferents. The bottom line labeled "brain" represents the stimulus profile as it might be represented in cortex after being refined by lateral inhibition. These effects are exaggerated here and would normally occur at several stages en route to cortex.

мой регистрации отдельных единиц (single-unit recording). В 1950-е годы Пауэлл и Маунткастл получили отведение от S1 с помощью таких электродов, подведенных перпендикулярно поверхности коры[14, 15]. Они обнаружили, что клетки, зарегистрированные по ходу одного вертикального прохода (track) электрода, имели перекрывающиеся рецептивные поля на поверхности тела (рис. 18.4). Более того, каждая клетка предпочтительно реагировала на один и тот же тип стимуляции — кожную вибрацию, например. Прохождение через новый участок коры, отстоящий на несколько миллиметров в сторону, приводило к смещению рецептивного поля регистрируемых нейронов в другую область тела и, иногда, к изменению модальности эффективного стимула. Таким образом, Пауэлл и Маунткастл установили важный принцип, который прослеживается во всей коре: корковые клетки организованы в колонки (columns) в соответствии с расположением рецептивного поля (соматотопией) и модальностью стимула.

Латеральное торможение

Рецептивные поля корковых нейронов существенным образом отличаются от полей первичных афферентных нейронов. Рецептивное поле первичных осязательных афферентных нейронов — это просто та область кожи, где стимуляция вызывает возбуждение. Рецептивное поле коркового нейрона, однако, устроено более сложно. Часто центральная область кожи, прикосновение к которой вызывает возбуждение, окружена областями торможения (рис. 18.4С). Это **тормозное окружение** обусловлено синаптическими взаимодействиями по ходу соматосенсорного пути. Торможение осуществляется через тормозные интернейроны, которые связаны со всеми соседними клетками, что названо **латеральным торможением**.

Латеральное торможение — это важный механизм для улучшения тактильного разрешения. Если касаться кожи двумя близко расположенными пробниками (рис. 18.5), афферентные окончания непосредственно под каждым пробником могут быть максимально активированы, но афферентные волокна, иннервирующие окружающие участки кожи, тоже будут возбуждены в результате распространения прогиба эластичной кожи. Если каждое афферентное волокно пропорционально вовлекает тормозные интернейроны в ядрах задних столбов, то максимально активированные афференты будут преобладать над своими менее активированными соседями. Вследствие этого, импульсация в волокнах, которые активированы в результате раздражения окружающих участков кожи, подавляется. Это улучшает способность коры отличать один большой пробник от двух маленьких.

Латеральное торможение может быть также рассмотрено как средство улучшения раз-

личения границ. Стимул, который приходится как на возбужденный центр, так и на тормозное окружение, будет менее эффективен, чем стимул, который прекращается (имеет границу) в пределах возбужденного центра. Это, опять же, иллюстрирует тот факт, что нервная система опирается на распознавание изменений, в данном случае — пространственных границ.

Параллельная обработка сенсорных модальностей

Передне-центральная извилина может быть разделена на несколько областей на основе различий в клеточной организации и сенсорной модальности (рис. 18.6). Область 3a является непосредственно смежной с первичной моторной корой, и нейроны там реагируют прежде всего на мышечные рецепторы растяжения и на другие глубокие рецепторы[17]. В противоположность этому, область 3b принимает входы от быстро и медленно адаптирующихся кожных рецепторов, особенно тех, которые имеют малые рецептивные поля. Специфическая локализация рецепторного типа в пределах подобластей S_1 иллюстрирует концепцию параллельной обработки в каждой сенсорной системе. Каждая область тела представлена в кожной зоне (3b), так же как и в зоне глубоких рецепторов (3a). Таким образом, соматотопическая корковая карта фактически состоит из множества представительств плана тела, по одному для каждой сенсорной модальности.

Точная анатомическая и функциональная организация соматосенсорной коры особенно ярко видна на примере проекции сенсорной иннервации от вибрисс мыши (рис. 18.7). Как и у людей, лицевая область коры у мыши непропорционально велика. Гистологические исследования Вулси и Ван дер Луза[18] показали, что эта область соматосенсорной коры у мыши содержит характерные группы нервных клеток, собранных вместе в пучки в форме цилиндров, которые лежат перпендикулярно в коре. Эти скопления были названы бочонками за свою форму, которая была выявлена путем реконструкции по серийным срезам. Каждый бочонок — от 100 до 400 мкм в диаметре — состоит из кольца клеток, окружающих сердцевину, содержащую немногочисленные клетки.

Массив бочонков у мыши обычно организован в пять рядов. Замечательно, что этот паттерн точно соответствует рядам вибрисс

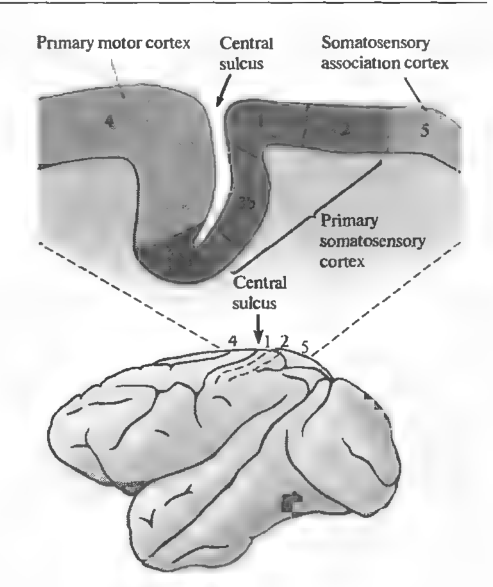


Рис. 18.6. Соматосенсорная кора. Подотдел первичной соматосенсорной коры (S_1) показан на сагиттальном срезе, проходящем через постцентральную извилину коры мозга обезьяны. S_1 подразделяется на зоны 3a, 3b, 1 и 2, лежащие позади центральной борозды. Зона 5 является частью соматосенсорной ассоциативной коры. Зона 4, лежащая спереди от центральной борозды, является первичной моторной корой.

Fig. 18.6. Somatosensory Cortex. The subdivisions of primary somatosensory cortex (S_1) are shown here on a sagittal section through the postcentral gyrus of the monkey cortex. S_1 is subdivided into areas 3a, 3b, 1, and 2, proceeding posteriorly from the central sulcus. Area 5 is part of the somatosensory association cortex. Area 4 lying anterior to the central sulcus is primary motor cortex.

на морде мыши — один бочонок для одного уса. Если ус удалить сразу после рождения, соответствующий бочонок исчезает из коры[19]. Деафферентация на более поздних этапах приводит к разнообразным изменениям, включая измененную экспрессию рецепторов нейромедиаторов в «бочоночной» коре[20, 21]. Функциональное значение бочонков подтверждено электрическим отведением от индивидуальных клеток коры[22, 23]. Каждая клетка отвечает на движение соответствующего уса — некоторые избирательно возбуждаются при движении уса в конкретном направлении. Таким образом, значительная часть соматосенсорной коры мыши занята обработкой информации, поступающей от механорецепторов, расположенных на морде. Мышь использует свои вибриссы как чувствительные антенны, двигая ими вперед и назад,

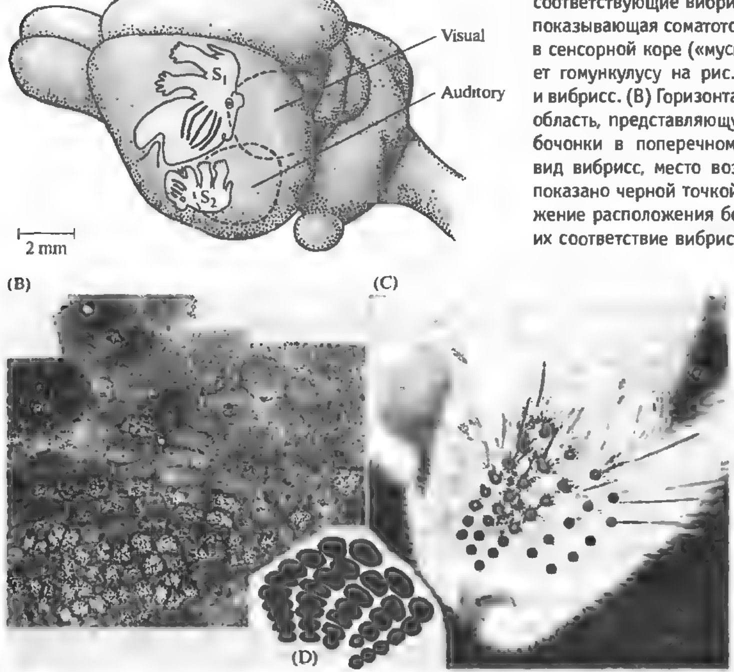


Рис. 18.7. Бочонки в соматосенсорной коре мыши, соответствующие вибриссам. (A) Схема мозга мыши, показывающая соматотопическое представительство в сенсорной коре («мускулус», который соответствует гомункулусу на рис. 18.3B), в частности, морды и вибрисс. (B) Горизонтальной срез коры мозга через область, представляющую вибриссы, показывающий бочонки в поперечном сечении. (C) Увеличенный вид вибрисс, место возникновения каждой из них показано черной точкой. (D) Схематическое изображение расположения бочонков на B, показывающее их соответствие вибриссам.

Fig. 18.7. Barrels in Mouse Somatosensory Cortex corresponding to vibrissae. (A) Diagram of a mouse brain showing the somatotopic representation on the sensory cortex (the "musculus," which corresponds to the homunculus in Figure 18.3B), particularly the face and vibrissae. S_2 is the secondary somatosensory cortex. (B) Horizontal section through the cortex in the area representing the vibrissae, showing barrels in cross section. (C) Close-up of whiskers, the origin of each marked by a black dot. (D) Schematic diagram of barrel arrangement from B, showing correspondence with vibrissae. (After Woolsey and Van der Loos, 1970.)

по мере того, как она движется, чтобы обнаруживать объекты по обе стороны своего пути[24].

Вторичная и ассоциативная соматосенсорная кора

Множественное представительство тела находится в первичной соматосенсорной коре (S_1). По мере удаление от центральной борозды, от области 3b до 1 и до 2, рецептивные поля становятся больше, и организация по принципу «центр — окружение», избирательность по направлению и интеграция субмодальности становятся все более выраженными в нейронном ответе[25, 26]. Область 1 лежит непосредственно позади области 3b и получает от нее активирующий вход. Область 2 получает вход как от 3a, так и от 3b.

В дополнение к первичной соматосенсорной коре, множественные представительства тела имеются в других, вторичных областях. В общем это зоны или полосы коры, которые лежат позади и вентролатеральнее по отношению к S_1. У приматов **вторичная соматосенсорная кора** (S_2) лежит на передней стенке боковой борозды, находясь вентральнее, чем S_1 (рис. 18.8). S_2 также соматотопически организована, и получает вход как от таламуса, так и от S_1. Если у приматов хирургически удалить S_1, активность клеток в S_2 значительно снижается[27]. Если из S_1 убраны только области 3b и 2 (где обрабатывается поверхностная, или кожная, стимуляция), то количество клеток в S_2, отвечающих на кожную стимуляцию, специфически уменьшается[28]. Результаты этих экспериментов свидетельствуют, что соматосенсорная информация поступает от S_1 к S_2. У других видов прямой таламический путь к S_2 имеет более важное значение[29].

Поток информации от S_1 к S_2 также может быть иерархическим в том смысле, что эта информация обрабатывается в S_1, а S_2 затем имеет дело уже с производными свойствами соматочувствительности. Например, когда обезьяна прикасается кончиками пальцев к вращающемуся барабану, во многих нейронах в S_1 импульсация возрастает пропор-



Рис. 18.8. Соматосенсорные области коры. Первичная соматосенсорная кора S_1 лежит в постцентральной извилине непосредственно позади центральной борозды. Соматосенсорные ассоциативные области коры (зоны 5 и 7 по Бродману) лежат позади от S_1. Вторичная соматосенсорная кора S_2 лежит ниже S1, в складке боковой борозды.

Fig. 18.8. Somatosensory Cortices. The primary somatosensory cortex, S_1, lies on the postcentral gyrus immediately behind the central sulcus. Somatosensory association cortices (Brodmann's areas 5 and 7) lie posterior to S_1. The secondary somatosensory cortex, S_2, lies below S_1, tucked into the lateral sulcus.

ционально увеличению неровности поверхности барабана, как если бы они управлялись непосредственно афферентным входом. В S_2, однако, многие нейроны сигнализируют об изменении текстуры, независимо от величины этого изменения[30)]. Другими словами, нейроны в S_2 выводят концепцию (различие в качестве поверхности) из более простой информации, поступающей в S_1. Другие наблюдения также свидетельствуют, что зона S_2 имеет дело со сложными аспектами сенсорного кодирования. Например, множество клеток в S_2 у приматов имеют билатеральные рецептивные поля[31)], отвечая на стимуляцию сходных областей на обеих сторонах тела.

Области 5 и 7 по Бродману представляют собой соматосенсорную ассоциативную кору. Нейроны, расположенные здесь, реагируют на стимуляцию кожи или движение конечности, но требования к стимулу у них сложны и отличаются от профилей реакции первичных сенсорных афферентов. Более того, нейроны здесь могут также реагировать на зрительную стимуляцию. Хотя специфические функции вспомогательных областей соматосенсорной коры до конца не понятны, ясно то, что тенденция к более сложно организованным стимулам в них возрастает по мере удаления от центральной борозды.

Болевые и температурные проводящие пути

Информация о вредоносных стимулах и температуре передается в высшие центры специфическими рецепторами и по путям, в значительной степени отличным от ощущений положения, прикосновения и давления. Ощущения боли и температуры передаются по миелинизированным и немиелинизированным афферентам малого диаметра, имеющим свободные нервные окончания в коже и других тканях. Окончания морфологически не специализированы, но могут быть разделены на разные подтипы, лучше реагирующие на осязательные стимулы, нагрев или охлаждение, повреждение и боль[32)]. Ноцицептивные и температурно-чувствительные афферентные аксоны подразделяются по величине на два класса. А-δ-волокна имеют от 1 до 4 мкм в диаметре и проводят возбуждение со скоростью от 6 до 25 м/с, а немиелинизированные С-аксоны от 0,1 до 1 мкм в диаметре — со скоростью от 0,5 до 2 м/с (глава 7).

Два типа волокон передают различные болевые ощущения. У человека короткий, интенсивный стимул, подаваемый на удаленный участок конечности, вызывает сначала острое и относительно короткое колющее болевое ощущение (первичная боль), за которым следует тупое, длительное ощущение жжения (вторичная боль). Электрофизиологические эксперименты показали, что первичная боль связана с активацией мелких миелинизированных волокон, а вторичная боль — с активацией С-волокон[33)—36)].

Центральные пути боли

Ноцицептивные и температурно-чувствительные афферентные аксоны образуют синапсы на клетках второго порядка внутри задних столбов спинного мозга. Волокна от клеток второго порядка переходят на противоположную сторону и восходят по двум основным путям: латеральному и вентральному спиноталамическим трактам (рис. 18.9). Восходящие волокна оканчиваются в вентробазальном и медиальном ядрах таламуса — поэтому они называются спиноталамическим трактом. Клетки в вентробазальном и медиальном ядрах таламуса проецируются на соматосенсорную кору и далее по всему мозгу. В отличие от нейронов высокого порядка в задних столбах (лемнисках), пути в таламусе и коре, получающие ноцицептивные вхо-

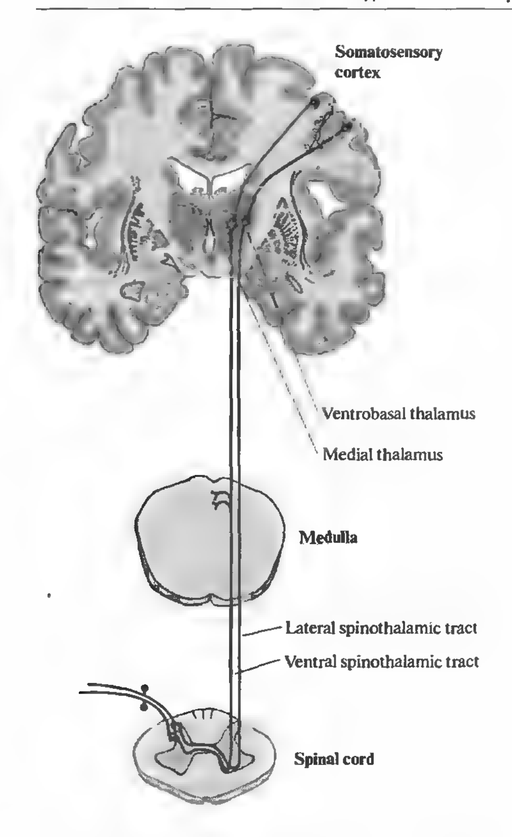


Рис. 18.9. Сенсорные проводящие пути, передающие болевые и температурные ощущения. Мелкие миелинизированные и немиелинизированные афферентные волокна оканчиваются ипсилатерально на сегментарных спинномозговых нейронах, аксоны которых идут контралатерально в составе вентрального и латерального спиноталамических трактов, оканчиваясь в медиальных и вентробазальных ядрах таламуса. Нейроны третьего порядка затем проецируются в кору мозга. Волокна вентрального спиноталамического тракта дают коллатеральные ответвления в продолговатом мозге, а некоторые из них оканчиваются на этом уровне (спиноретикулярный тракт не показан).

Fig. 18.9. Sensory Pathways Mediating Pain and Temperature, shown on cross sections of the spinal cord and medulla and a coronal section of the brain. Small myelinated and unmyelinated fibers enter the spinal cord to form synapses with second-order neurons. The second-order axons cross the midline to ascend in the ventral and lateral spinothalamic tracts to end in the medial and ventrobasal nuclei of the thalamus. Third-order cells then project to the cerebral cortex. Cells in the ventral spinothalamic tract give off collateral branches in the medulla, and some terminate at this level (the spinoreticular tract; not shown).

ды, обладают большими, нечетко локализованными рецептивными полями, часто билатерально покрывающими обширные области тела[38].

Хотя афферентные ноцицепторы имеют свои собственные пути в коре, ясно, что вредоносные стимулы могут распространяться по тем же восходящим путям в составе задних столбов (лемнисков), которые проводят возбуждение от рецепторов других модальностей. Действительно, многочисленные эксперименты показали, что две соматосенсорные системы взаимодействуют. В частности, легкое прикосновение или постукивание по коже может повлиять на разряд ноцицептивных нейронов в центральной нервной системе. Активация (постукиванием) соматосенсорных афферентов, имеющих перекрывающиеся рецептивные поля, вызывает тормозное влияние на ноцицептивные разряды коровых или таламических нейронов[39], что позволяет предположить, что синаптическое взаимодействие в спинном мозге «открывает ворота» болевым ощущениям[40].

Синаптическая передача между болевыми афферентами и спиноталамическими нейронами второго порядка в составе заднего рога тормозится интернейронами, которые действуют как пре-, так и постсинаптически (рис. 18.10). Эти тормозные интернейроны могут быть активированы коллатералями афферентов большого диаметра (лемнисковые афференты). Таким образом, рецепторы осязания в коже могут подавить ощущение боли путем такого взаимодействия. Тема модуляции болевого ощущения привлекла к себе значительное внимание с открытием опиоидных рецепторов в центральной нервной системе и с определением природных опиато-подобных пептидов в специфических нейронах, выполняющих ноцицептивную функцию[1] (см. обсуждение пептидных нейротрансмиттеров в главе 14)[41].

Как в других сенсорных системах, нисходящие влияния от высших центров могут серьезно изменить поток сенсорной информации о вредоносных стимулах, который достигает сознания[42, 43]. Обсуждение конкретных путей, обеспечивающих эти влияния,

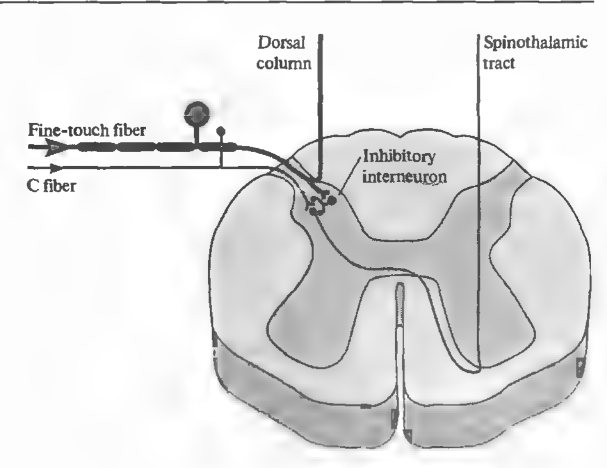


Рис. 18.10. Соматосенсорное торможение передачи боли. Синаптическая передача от болевых афферентов на нейроны второго порядка в спинном мозге уменьшается тормозными интернейронами. Тормозные интернейроны могут активироваться сенсорными афферентными волокнами большого диаметра (которые передают ощущения тонкого прикосновения или вибрации).

Fig. 18.10. Somatosensory Inhibition of Pain Transmission. Synaptic transmission from pain afferents to second-order neurons in the spinal cord is reduced by inhibitory interneurons. The inhibitory interneurons can be activated by collaterals of large-diameter sensory fibers (such as those that mediate fine touch or vibration sense).

можно найти в содержательной монографии Филдза[44] о нейрофизиологических и клинических аспектах боли. Этот путь начинается в среднем мозге от группы клеток серого вещества периакведуктальной области. Как было обнаружено в некоторых случаях, стимуляция этой области имплантированными электродами вызывает избирательное снижение сильной клинической боли[45]. Считается, что задействованные в этом клетки являются энкефалинергическими и проецируются на серотонинергические нейроны в ростральной части ствола мозга (rostral medulla). Стволовые нейроны затем посылают нисходящие волокна по дорсолатеральному фуникулярному тракту спинного мозга в задние рога, а именно в I и II слои. Там они образуют синапсы с интернейронами и терминалями афферентных волокон, модулируя передачу в болевых путях. Нисходящие волокна сопровождаются норадренергическими волокнами, принадлежащими ко второму пути, берущему начало в дорсолатеральном отделе моста, который также задействован в модуляции боли.

Сама боль остается нечетким и сложным понятием, выходящим за пределы данной книги. В отличие от анализа зрительной, слуховой и соматосенсорной систем, обсуждение боли со всем ее высоким эмоциональным содержанием неизбежно сталкивается с рассмотрением субъективных вопросов, чувств, подобных «горю» и «страданию», которые в настоящее время не могут быть выражены языком нейробиологии (точно так же, как «созерцание заката» или «чувство тепла» не может рассматриваться в этих терминах). Тем не менее определенные соотношения между нервной деятельностью и болью очевидны. Так, общеизвестное переживание острой, четко локализованной приступообразной боли, после которой следует тупое, постепенно растекающееся, плохо локализованное жжение, может быть приписано активности волокон А-δ и С. Подобным же образом обезболивающий эффект постукивания по коже может быть объяснен синаптическими взаимодействиями на уровне спинного мозга, таламуса и коры. Особенно притягательна идея, что уровень воспринимаемой боли может быть снижен нисходящими влияниями, которые включают в себя действие морфиноподобных пептидов, дающих возможность солдату, который бросается в битву, не замечать ран и повреждений, которые при нормальных обстоятельствах были бы чрезвычайно болезненны.

§ 2. Слуховая система: кодирование частоты звука

Соматосенсорная система анализирует стимулы на основе их расположения на карте тела. Благодаря аналогичному процессу, зрительные стимулы являются ретинотопически картированными и анализируются на предмет их местоположения в визуальном (пространственном) мире. Однако слуховая система использует совершенно иной метод анализа. Слуховая периферия, или **улитка**, картирует звуковые стимулы скорее по их частотному содержанию, чем по пространственному расположению, и последующие стадии слуховой системы используют этот тонотопический анализ, чтобы определить смысл речи и значение других сложных звуков. Как частота звука кодируется волосковыми клетками улитки, и как эти сигналы обрабатываются

на более высоких уровнях слуховой системы? Как определяется пространственное расположение звука?

У наземных позвоночных звуковые волны в воздухе входят во внешнее ухо, колеблют **барабанную перепонку** и, благодаря серии механических сопряжений в среднем ухе, конвертируются в колебания жидкости улитки. Колебания жидкости, в свою очередь, вызывают вибрацию **базилярной мембраны**, на которой находятся сенсорные **волосковые клетки** в составе **органа Корти**. Этот процесс описан поэтически Олдосом Хаксли:

> *Трубный звук Понгилеони и скрежет безымянных скрипок потрясли воздух в большой зале, вызвали дрожь в оконных стеклах, и это, в свою очередь, сотрясло воздух в апартаментах лорда Эдварда на дальней стороне. Сотрясающийся воздух задребезжал в барабанных перепонках лорда Эдварда; соединенные между собой косточки молоточка (ушной косточки), наковальни внутреннего уха и стремени (слуховой кости среднего уха) были приведены в движение, так что возбудили мембрану окна (oval window) и подняли бесконечно малую бурю в жидкости лабиринта. Волосковые окончания слухового нерва дрожали, как водоросли в бушующем море; огромное количество непонятных чудес произошло в мозгу, и лорд Эдвард в экстазе прошептал: «Бах!»*

Улитка

Канал улитки разделен на три отдела. **Средняя лестница** (scala media) содержит раствор с высоким содержанием калия, эндолимфу. Он отделен от покрывающей его **вестибулярной лестницы** (scala vestibuli) Рейсснеровой мембраной, а от наполненного жидкостью пространства **барабанной лестницы** (scala timpani) — тесными межклеточными соединениями между апикальными окончаниями волосковых клеток и окружающими вспомогательными клетками (рис. 18.11B). Барабанная и вестибулярная лестницы содержат перилимфу, сходную по составу с цереброспинальной жидкостью; средняя лестница содержит эндолимфу, ионный состав которой похож на состав цитоплазмы: высокое содержание калия, низкое — натрия и с концентрацией кальция, поддерживаемой на микромолярном уровне[47, 48]. Необычный состав внеклеточной жидкости устанавливается благодаря работе ионных насосов в клетках, расположенных в **сосудистом слое** (stria vascularis), т. е. в секреторном эпителии, выстилающем боковую стенку средней лестницы.

Существуют две различные группы волосковых клеток в улитке млекопитающих: **внутренние волосковые клетки** и **внешние волосковые клетки**. Они различаются по своему расположению (внутренние волосковые клетки ближе к центральной оси спирали улитки) и по паттерну иннервации. Внутренние волосковые клетки получают более 90 % афферентных контактов улитки[49)–51)]; внешние волосковые клетки являются постсинаптическими мишенями для эфферентной иннервации (рис. 18.11C)[52)]. Эти различия в паттернах иннервации ставят интересные вопросы, касающиеся функциональной роли этих двух типов клеток, которые будут обсуждаться далее в этой главе. **Покровная мембрана** (tectorial membrane) налегает на волосковые пучки как внутренних, так и внешних волосковых клеток, и различие в движении покровной и базилярной мембран приводит к боковому сдвигу, открывающему каналы механотрансдукции (как описано в главе 17).

Частотная избирательность: механическая настройка

Звуковое восприятие — это не просто вопрос выявления звукового стимула. Информационное содержание звука является функцией его частотного состава. Таким образом, слуховая система зависит от способности ее механосенсорных волосковых клеток быть частотно-избирательными. В улитке млекопитающих настройка по частоте зависит от механических свойств специализированной структуры, в которой находятся сенсорные клетки, аналогично механической адаптации, осуществляемой многослойной капсулой в тельце Пачини. Ширина и толщина базилярной мембраны закономерно меняется по длине канала улитки (рис. 18.11A). У основания улитки (ближе к овальному окну) базилярная мембрана узкая и жесткая; у противоположного конца (вершина улитки) она широкая и гибкая. По причине этой изменяющейся жесткости входящие звуковые волны вызывают движение жидкости и вибрацию базилярной мембраны в разных участках в зависимости от частоты звука.

Это свойство функции улитки было описано фон Бекеси[53)], который использовал стробоскопическое освещение отражающих частиц, рассеянных в улитке, чтобы визуализировать паттерн вибрации. Он обнаружил, что звуки высокой частоты вызывают максимальные колебания на более толстой, жест-

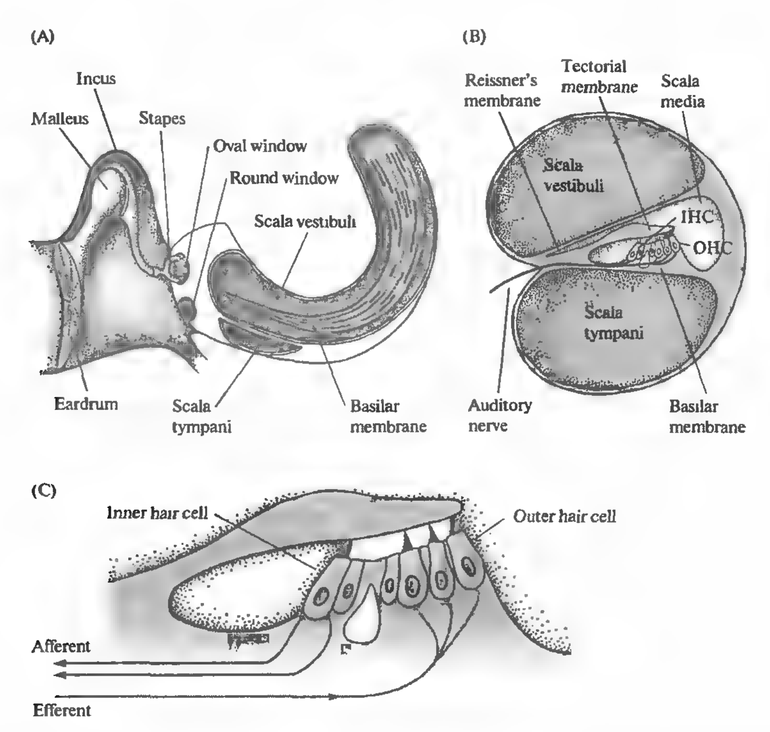
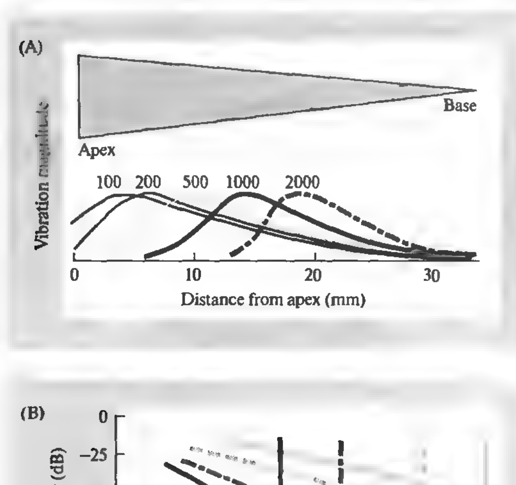


Рис. 18.11. Структура улитки. (A) Схема среднего уха и улитки, показывающая систему косточек, с помощью которых барабанная перепонка соединена с мембраной овального окна улитки. Улитка дана рассеченной и не скрученной, чтобы показать ее основные внутренние полости (вестибулярную и барабанную лестницы) и форму базилярной мембраны, расширяющейся от основания улитки к ее вершине. (B) Поперечный разрез улитки, показывающий структурные взаимоотношения между базилярной мембраной, внутренними (IHC) и наружными (OHC) волосковыми клетками и покровной мембраной. (C) Иннервация волосковых клеток улитки. Около 95 % афферентных волокон являются постсинаптическими мишенями для IHC. До 20 афферентных волокон контактирует с одиночной IHC. OHC имеют мало афферентных связей, зато являются постсинаптическими мишенями для холинергических эфферентных нейронов, которые проецируются из оливарного комплекса, расположенного в стволе мозга.

Fig. 18.11. Structure of the Cochlea. (A) The middle ear and cochlea, showing the eardrum and its bony connections to the oval window. The cochlea is represented as unwound and cut open to show the major internal compartments (scala vestibuli and scala tympani), and overlying structures have been removed to reveal the shape of the basilar membrane, which is narrow near the cochlear base and broad at the apex. (B) Cross section of the cochlea, showing the scala media (which contains endolymph, a high-potassium solution) and the structural relations among the basilar membrane, inner hair cells (IHC) and outer (OHC) hair cells, and tectorial membrane. Hair cells form synapses on the terminals of auditory nerve fibers that have their cell bodies in the spiral ganglion. (C) Innervation of cochlear hair cells. Approximately 95 % of afferent fibers are postsynaptic to IHCs. As many as 20 afferent fibers contact a single IHC. OHCs have few afferent contacts but instead are the postsynaptic targets of cholinergic efferent neurons that project from the olivary complex in the brainstem.

кой нижней части мембраны, а звуки низкой частоты вызывают максимальную вибрацию на более гибкой верхней части мембраны улитки. Фон Бекеси назвал этот паттерн колебаний «бегущей волной».

Как следствие механической настройки базилярной мембраны, волосковые клетки и их постсинаптические афферентные волокна у основания улитки преимущественно стимулируются высокочастотным звуком, тогда как те, что находятся у вершины улитки, лучше всего реагируют на низкочастотный звук (рис. 18.12). Частотная избирательность афферентов улитки может быть измерена при помощи отведения потенциалов действия, возникающих в ответ на чистые тона звука,



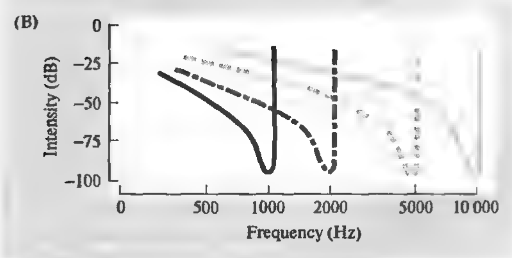


Рис. 18.12. Настройка улитки. (А) Локализация участков улитки, в которых звуковые волны вызывают максимальное смещение базилярной мембраны, зависит от частоты. Кривые представляют относительное смещение на указанных частотах (100–2 000 Гц). (B) Типичные кривые настройки четырех индивидуальных волокон слухового нерва, иннервирующих различные участки улитки. Показана зависимость между частотой звукового стимула и интенсивностью звука в децибелах (dB), необходимой для возникновения разряда в волокне. Пики соответствуют оптимальным звуковым частотам (т. е. частотам, при которых интенсивность стимула для каждого волокна минимальна).

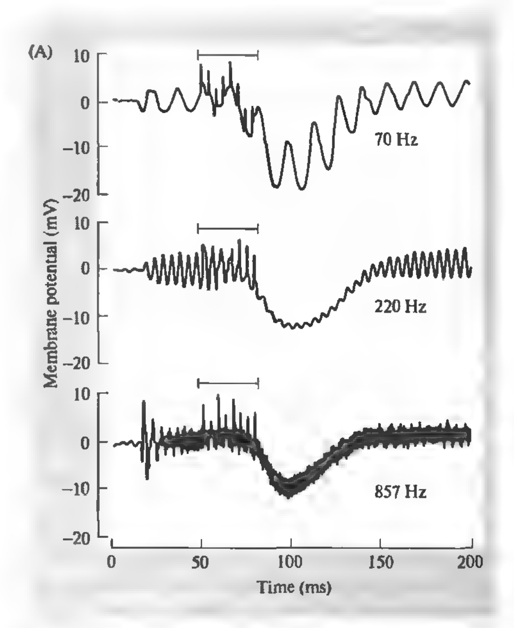
Fig. 18.12. Cochlear Tuning. (A) The location of maximum displacement of the basilar membrane in the cochlea by sound waves depends on frequency. The curves represent relative displacement at the indicated frequencies (100–2 000 Hz). At the low frequencies, maximum displacement is near the wider (more flexible) apical membrane; higher frequencies produce maximal displacement near the narrower (stiffer) base. (B) Typical tuning curves of four individual eighth-nerve fibers innervating different locations on the cochlea. Sound intensity in decibels (dB) needed to produce discharges in a fiber is plotted against frequency of the auditory stimulus. The best frequencies for the fibers (i. e., the frequencies requiring the least stimulus intensity) are 1 000, 2 000, 5 000, and 10 000 Hz. (A after von Bekesy, 1960; B after Katsuki, 1961.)

частота и интенсивность которых систематически варьирует. Результирующая **кривая настройки** V-образна, с оптимальной, или характеристической, частотой, определяемой как чистый тон, к которому волокно наиболее чувствительно. Характеристическая частота каждого волокна определяется по тому, где именно в канале улитки оно контактирует с волосковой клеткой.

Звуковая частота картируется на протяжении эпителиального массива рецепторов, производящих кохлеотопическую, или тонотопическую карту частоты. Поэтому, слуховая система может использовать принципы нейронной обработки — такие, как латеральное торможение — основанные на тонотопии, чтобы истолковывать и обрабатывать информацию, закодированную в звуковой частоте таким же образом, как соматотопические карты лежат в основе обработки соматосенсорных сигналов.

Эфферентное торможение улитки

Как и мышечные веретена, слуховые рецепторы подвергаются эфферентной регуляции. Нейроны комплекса верхних олив (olivary complex) в стволе мозга млекопитающих проецируются на ипсилатеральную и контралатеральную улитку[54)]. Активация этого пути вызывает высвобождение ацетилхолина в эфферентных синапсах на волосковых клетках и подавляет ответы на звук в афферентных волокнах улитки[55, 56)]. Эфферентная обратная связь снижает чувствительность улитки при наличии фонового шума и снижает риск перегрузки[57)]. Это — аналог переустановки чувствительности мышечного веретена гамма-эфферентами, поддерживающими поток информации во время движения конечности в широком диапазоне положений (глава 22). Эфферентные волокна активируются звуком и иннервируют ограниченные области улитки; в результате подавление шума носит частотно-специфический характер[58)—61)]. В дополнение к восстановлению динамического диапазона торможение расширяет кривую настройки афферентных волокон. Наконец, эфферентная обратная связь может защитить улитку от повреждения громким звуком[62)]. Фактически, сила эфферентной обратной связи находится в обратном соотношении со степенью аку-



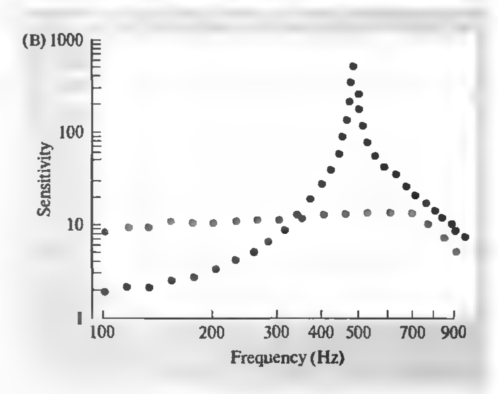


Рис. 18.13. Влияние эфферентной стимуляции волосковых клеток улитки на звуковые стимулы. (А) Средняя запись: осцилляторный ответ волосковой клетки на звуковой стимул частотой 220 Гц (резонансная частота) тормозится короткой пачкой эфферентных стимулов (обозначено полоской), и клетка гиперполяризуется. Верхняя запись: ответ на звуковой стимул при 70 Гц. Интенсивность стимула подобрана таким образом, что осцилляторный ответ был близок по амплитуде ответу на звуковой стимул частотой 220 Гц. Эфферентная стимуляция также вызывает гиперполяризацию, однако не ослабляет, а, наоборот, усиливает осцилляторный ответ. Нижняя запись: то же при частоте 857 Гц, однако этот ответ не изменяется при эфферентной стимуляции. (В) Чувствительность другой волосковой клетки (в мВ на единицу звукового давления) показана как функция частоты при эфферентной стимуляции (серым цветом) и в ее отсутствии (черным). Эфферентное торможение снижает ответ при резонансной частоте и повышает чувствительность на более низких частотах, в результате чего настройка нарушается.

Fig. 18.13. Effect of Efferent Stimulation on cochlear hair cell responses to acoustic stimuli. (A) Center record: The oscillatory response of a cell to an acoustic stimulus of 220 Hz (its resonant frequency) is inhibited by a brief train of efferent stimuli (indicated by the bar), and the cell is hyperpolarized. Upper record: The response to an acoustic stimulus at 70 Hz. The stimulus intensity was adjusted so that the oscillatory response was similar in magnitude to that at 220 Hz. Efferent stimulation produces a hyperpolarization, but an increase rather than a decrease in the oscillatory response. Lower record: The oscillatory response to an 857 Hz stimulus (again adjusted to produce a response similar to that at the resonant frequency) is unchanged by efferent stimulation. (B) Sensitivity of another cell (in millivolts per unit of sound pressure) as a function of frequency in the absence (grey) and presence (black) of efferent stimulation. Efferent inhibition reduces the response at the resonant frequency and increases the sensitivity at low frequencies, thereby degrading tuning. (A after Art et al., 1985; B after Fettiplace, 1987.)

стического повреждения, вызванного громким звуком[63].

Активация эфферентного пути к уху черепахи вызывает большие гиперполяризирующие тормозные постсинаптические потенциалы (IPSP) в волосковых клетках[64, 65]. Влияние торможения на ответ волосковой клетки на звук показан на рис. 18.3А. Клетка была стимулирована чистыми тонами на трех частотах, одна из которых является оптимальной для данной волосковой клетки, вторая — более высокой частотой, и третья — более низкой частотой. Интенсивности тонов были отрегулированы так, что все они вызывали осциллирующий рецепторный потенциал одной и той же амплитуды. Короткая серия стимулов, поданная на эфферентное волокно, гиперполяризировала клетку и сильно ослабила ее ответ на тон при 220 Гц (характеристическая частота). На более низкой и высокой частотах акустической стимуляции активация эфферентов по-прежнему приводила к гиперполяризации, но низкочастотная осцилляция даже увеличивалась по амплитуде, тогда как на высоких частотах амплитуда была неизменна. Этот дифференциальный эффект торможения приводит к расширению частотного диапазона ответов волосковых клеток (рис. 18.13В).

Механизм холинергического торможения был исследован в волосковых клетках цыпленка[66, 67]. Ацетилхолиновые (АХ) рецепторы

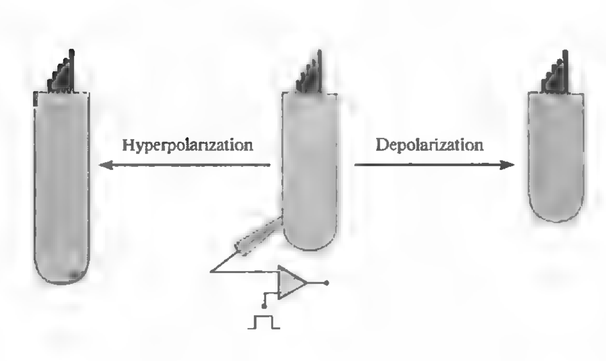


Рис. 18.14. Электрическая подвижность наружных волосковых клеток. Для фиксации мембранного потенциала наружных волосковых клеток, изолированных из улитки позвоночных, были использованы пэтч-пипетки. Деполяризация приводила к укорочению клеток; гиперполяризация делала их длиннее. Такие изменения длины могли быть достаточно веяики, достигая 30 нм/мВ.

Fig. 18.14. Electromotility of Outer Hair Cells. Whole-cell patch pipettes are used to clamp the membrane potential of outer hair cells isolated from the mammalian cochlea. Depolarization causes the cells to shorten; hyperpolarization makes them longer. Such length changes can be as large as 30 nm/mV.

являются лиганд-регулируемыми катионными каналами, через которые натрий и кальций входят в клетку, приводя к активации кальцийзависимых калиевых каналов и к гиперполяризации мембраны (глава 10). Подобный холинергический механизм торможения обнаружен в волосковых клетках млекопитающих[68)–70)]. Ответы волосковых клеток на АХ блокируются α-бунгаротоксином, и есть надежное доказательство того, что необычный член семейства никотиновых рецепторов $\alpha 9$ является лиганд-связующей субъединицей АХ рецептора волосковой клетки[71)–73)].

Электрическая подвижность волосковых клеток улитки млекопитающих

Эфферентные нейроны, которые тормозят ответы улитки, образуют синапсы на внешних волосковых клетках, но не на внутренних волосковых клетках, которые генерируют нейрональный выход улитки млекопитающих. Как этот тормозящий эффект передается от внешней к внутренней волосковой клетке?

Важное свойство внешней волосковой клетки в улитке млекопитающих — **электрическая подвижность**. Внешние волосковые клетки, изолированные из улитки млекопитающих, укорачиваются, реагируя на деполяризацию, и удлиняются во время гиперполяризации их мембран (рис. 18.14)[74, 75)]. Эти движения не вызываются актин-миозином, но возникают в результате прямых эффектов электрического потенциала на заряженные «моторные» протеины в базолатеральной мембране[76)–78)]. Каков бы ни был механизм электрической подвижности внешних волосковых клеток, она также способствует вибрации структуры улитки во время звуковой стимуляции, и, таким образом, увеличивает отклонение стереоцилиев внутренних волосковых клеток[79)].

Внешние волосковые клетки улучшают настройку улитки, сообшая дополнительную механическую энергию движению базилярной мембраны (рис. 18.15). Это объясняет, как эфферентные синапсы, образованные на внешних волосковых клетках, подавляют звуковой ответ внутренних волосковых клеток. Поскольку подвижность внешних волосковых клеток вызывается изменениями мембранного потенциала, синаптическое торможение действует так, что подавляет электрическую подвижность аналогично тормозным эффектам в других областях нервной системы. Торможение уменьшает активный механический вклад внешних клеток в колебания структур улитки и, таким образом, опосредованно снижает возбуждение внутренних волосковых клеток.

Электрическая настройка волосковых клеток

Уши немлекопитающих позвоночных также частотно избирательны, несмотря на то, что у них базилярные мембраны не расширяются и не поддерживают механически настроенные бегущие волны. Кроуфорд и Феттиплейс предприняли исследования на черепахе, чтобы показать, что механосенсорные волосковые клетки обладают встроенной частотной избирательностью благодаря механизму электрической настройки[80)]. Внутриклеточные отведения от волосковой клетки базилярного сосочка черепахи (слуховой сенсорный эпителий) показаны на рис. 18.16. Когда подавался короткий звуковой стимул (щелчок), возникали затухающие колебания мембранного

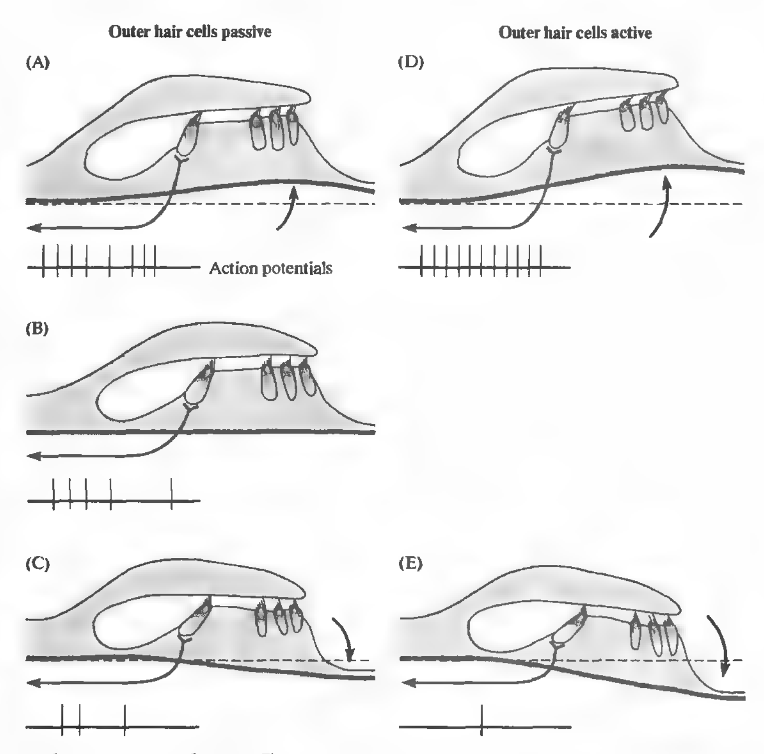
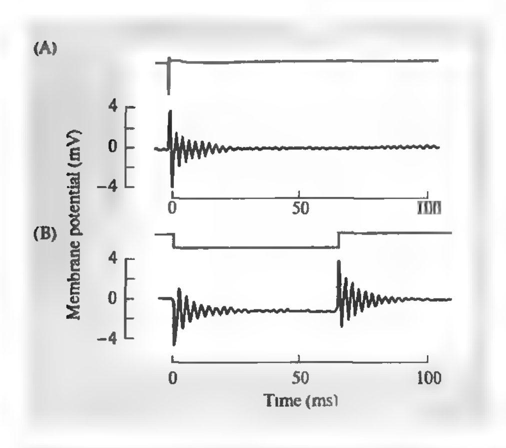


Рис. 18.15. Движение структур улитки. Во время волновых колебаний жидкости, вызванных звуком, подвижные структуры улитки (базилярная мембрана и орган Корти) перемещаются вверх и вниз. (A) Во время фазы разрежения звуковой волны базилярная и покровная мембраны смещаются вверх, приводя к отклонению волосковых пучков в направлении наиболее длинного стереоцилия — деполяризация волосковых клеток по сравнению с состоянием покоя (B). (C) Перемещение вниз во время фазы сжатия звуковой волны вызывает противоположное отклонение волосковых пучков и волосковые клетки гиперполяризуются относительно спокойного состояния. (D) Активное сокращение наружных волосковых клеток во время деполяризации усиливает направленное вверх смещение базилярной мембраны. (E) Гиперполяризация наружных волосковых клеток приводит к их удлинению. Результирующий эффект состоит в увеличении смещения базилярной мембраны за счет «мышечного» действия наружных волосковых клеток, что отражается в паттерне активности волокон, контактирующих с наружными волосковыми клетками.

Fig. 18.15. Motion of the Cochlear Partition. During sound-evoked fluid waves, the cochlear partition (basilar membrane and organ of Corti) moves up and down. (A) During the rarefaction phase of a sound wave, the basilar membrane and tectorial membrane move upward, resulting in a shearing motion toward the longest stereocilia of the hair bundle—depolarizing the hair cells relative to the resting condition (B). (C) Downward motion during the compressive phase of a sound produces the opposite displacement of the hair bundles, and hair cells are hyperpolarized relative to rest. (D) Active contraction of outer hair cells during depolarization accentuates the upward motion of the basilar membrane. (E) Hyperpolarization of outer hair cells causes them to elongate. The net effect is that motion of the basilar membrane is greater because of the "muscular" action of the outer hair cells, and this is reflected in the activity pattern of afferent fibers contacting the inner hair cells. The extent of motion is greatly exaggerated here for the purpose of illustration.

потенциала волосковой клетки или осциллирующий ответ с частотой около 350 Гц. Это та же частота, что и у чистых тонов, к которым волосковые клетки наиболее чувствительны, как показано на рис. 18.16C. Здесь тон постоянной интенсивности подавался на внешнее ухо, и его частота постепенно менялась от 20 до 1 000 Гц. Электрический ответ волосковой клетки достигал пикового значения при 350 Гц. Осцилляция потенциала, вызванная коротким звуковым сигналом, и кривая настройки, полученная путем подбора частоты, являются эквивалентными средствами для измерения частотной избирательности волосковой клетки.

Рис. 18.16B показывает, что когда микроэлектрод использовали для пропускания в клетку прямоугольного толчка тока, возникала осцилляция потенциала, частота и скорость затухания которой были идентичны той, что была вызвана звуковым входом. Вывод из этих экспериментов состоит в том, что частотная избирательность волосковых клеток зависит от электрических свойств мембраны. Электрически и акустически настраиваемые частоты волосковых клеток эквива-



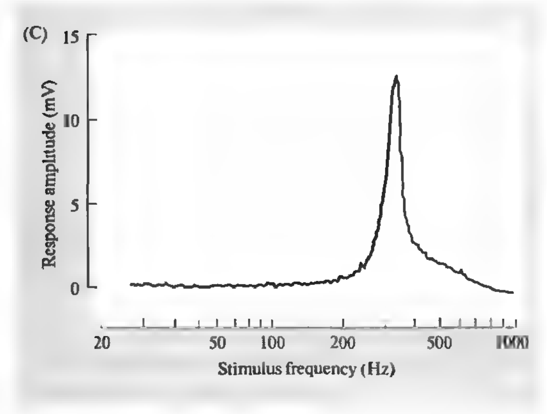


Рис. 18.16. Настройка волосковых клеток в улитке черепахи. (A) Влияние звукового щелчка (верхняя линия) на мембранный потенциал волосковой клетки (нижняя линия), зарегистрированный внутриклеточно. Щелчок вызывает затухающее колебание мембранного потенциала с частотой около 350 Гц, начальной пиковой амплитудой около 8 мВ. (B) Гиперполяризующий толчок тока (верхняя линия), приложенный к той же клетке, вызывает сходные осцилляции как при включении, так и при выключении толчка, показывая, что частота колебаний является внутренним свойством волосковой клетки. (C) Если такую волосковую клетку стимулировать чистыми тонами, плавно меняющимися по частоте от 25 до 1 000 Гц, пиковая амплитуда рецепторного потенциала имеет острый максимум при 350 Гц.

Fig. 18.16. Hair Cell Tuning in the turtle cochlea. (A) The effect of an acoustic click (indicated by the upper trace) on the membrane potential of a hair cell (lower trace, relative to the resting membrane potential of −50 mV), recorded with an intracellular microelectrode. The click produces a damped oscillation in membrane potential at a frequency of about 350 Hz, with an initial peak-to-peak amplitude of about 8 mV. (B) A hyperpolarizing current pulse (upper trace) applied to the same cell produces similar oscillations at both the onset and termination of the pulse, indicating that the frequency of oscillation is an intrinsic electrical property of the hair cell. (C) When a hair cell with oscillatory responses such as those seen in A and B is stimulated with pure tones ranging from 25 to 1 000 Hz, the peak-to-peak amplitude of the receptor potential has a sharp maximum at about 350 Hz. (After Fettiplace, 1987.)

лентны и закономерно изменяются по длине базилярного сосочка черепахи, создавая тонотопический массив настроенных детекторов.

Калиевые каналы волосковых клеток и их настройка

Какие свойства клеточной мембраны обеспечивают эту электрическую настройку и как эти свойства варьируют, определяя настройку на определенную частоту? Отведение от волосковых клеток мешочка лягушки (вестибулярный сенсорный орган) показало, что взаимодействия между потенциалзависимыми кальциевыми и кальций-активируемыми калиевыми каналами может вызывать осцилляцию потенциала[81, 82]. Исследования волосковых клеток, изолированных из уха черепахи[83, 84], показали, что характеристическая частота каждой клетки определена чрезвычайно элегантным и простым путем — а именно плотностью и кинетическими свойствами кальций-активируемых калиевых каналов в каждой клетке (рис. 18.17). Их называют BK-каналами (от “big K+”) из-за большой проводимости одиночного канала.

В клетках, настроенных на более низкие частоты, суммарная калиевая проводимость мала и медленнее активируется, и таким образом способствует возникновению относительно медленных электрических колебаний. В клетках с более высокой частотой калиевая проводимость больше и активация быстрее. В самых низкочастотных волосковых клетках еще более медленные, исключительно потенциалзависимые калиевые каналы поддерживают колебания[85]. BK-каналы в волосковых клетках цыплят[86] и черепах[87] кодируются геном, тРНК которого обладает альтернативным сплайсингом[88, 89], и некоторые дифференциально расщепляемые изоформы канала кинетически различны[90]. Дополни-

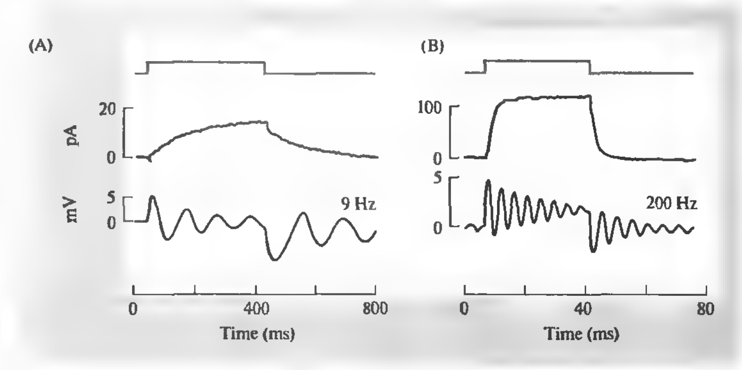


Рис. 18.17. Частота настройки и калиевая проводимость в изолированной волосковой клетке черепахи, измеренные с помощью пэтч-кламп отведения от целой клетки. (А) Средняя запись показывает выходящий ток, обусловленный, в основном, калием, возникающий в ответ на деполяризующее смещение потенциала (длительность которого показана на верхней записи). Ток медленно нарастает до максимума в 15 пА с постоянной времени около 200 мс. Небольшой сдвиг тока такой же длительности вызывает осцилляторное изменение напряжения в начале и в конце толчка (нижняя запись) с резонансной частотой 9 Гц. (В) В другой клетке сходный деполяризующий толчок вызывает значительно больший по величине, быстро нарастающий выходящий ток, свидетельствующий о более высокой плотности калиевых каналов с более быстрой кинетикой. Частота настройки осцилляторного ответа также пропорционально возрастает до 200 Гц.

Fig. 18.17. Tuning Frequency and Potassium Conductance in isolated turtle hair cells measured by whole-cell patch clamp recording. (A) The middle record shows outward current, carried mainly by potassium, produced by a depolarizing voltage command (duration indicated in the top record). Current rises slowly to a maximum of 15 pA, with a time constant of about 200 ms. A small current step of the same duration produces oscillatory voltage responses at the beginning and end of the pulse (lower record) with a resonant frequency of 9 Hz. (B) In another cell, a similar depolarizing pulse produces a much larger, rapidly rising outward current (middle record; note the changes in current and timescales), indicating a greater density of potassium channels with faster kinetics. The oscillatory response to a small current pulse reveals a concomitant increase in tuning frequency to 200 Hz (lower record). (After Fettiplace, 1987.)

тельная вариабельность обеспечивается вспомогательной β-субъединицей, которая встраивается в канал и замедляет кинетику его открывания[91]. Эта β-субъединица экспрессируется в тонотопическом паттерне, появляясь в больших количествах в клетках вершины улитки, где обнаруживается настройка на низкие частоты.

Слуховые проводящие пути

Основные слуховые пути схематично представлены на рис. 18.18. Слуховые волокна восьмой пары черепномозговых нервов направляются центрально и посылают ветви как в дорзальные, так и в вентральные кохлеарные ядра[92]. Аксоны второго порядка восходят в составе контралатерального бокового лемниска, иннервируя клетки в нижних бугорках четверохолмия (ядро бокового лемниска является станцией синаптического переключения для некоторых из этих волокон). Нейроны в вентральном кохлеарном ядре также дают коллатеральные ветви как к ипсилатеральным, так и к контралатеральным ядрам верхних олив. Клетки третьего порядка, расположенные в ядрах верхних олив, в свою очередь, посылают восходящие волокна в нижние бугры четверохолмия. Путь продолжается через ядра медиального коленчатого тела таламуса к слуховой области поперечной височной извилины верхней части височных долей коры головного мозга. Каждый уровень в слуховом пути тонотопически картируется.

По мере продвижения к более высоким отделам слуховой системы чистые тона становятся все менее важными в качестве стимулов для отдельных клеток. Например, клетки в дорзальном кохлеарном ядре и нижних буграх четверохолмия тормозятся тонами, которые не совпадают с их характеристической частотой[93, 94]. Клетки в слуховой коре реагируют на комбинации тонов, на бинауральные, но не монауральные звуки, а также на другие сложные слуховые стимулы[95)—97]. Когда обнаруживаются клетки, которые действительно реагируют на чистые тона, их частотная избирательность зачастую выше, чем у первичных афферентных волокон. Таким образом, кривая настройки (отношение порога к частоте) корковых нейронов острее, чем кривая первичного афферента[98] (рис. 18.19А). Это обострение частотной избирательности ответа

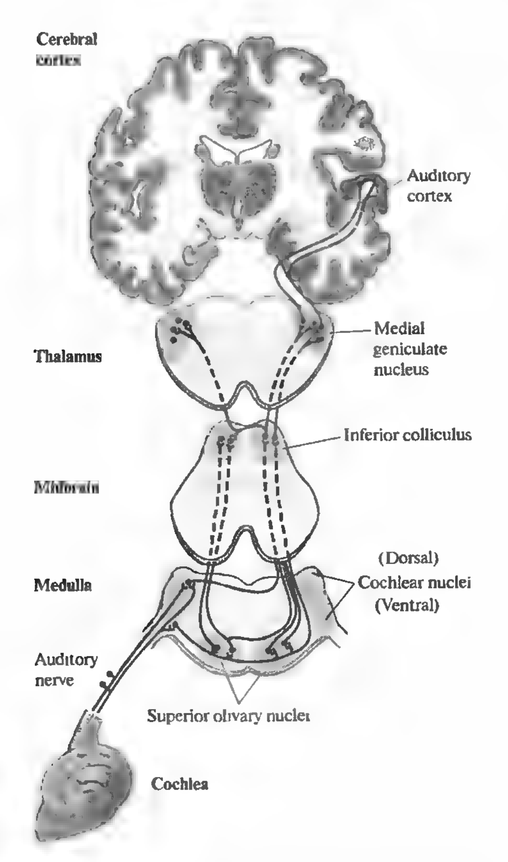


Рис. 18.18. Центральные слуховые пути. Волокна слухового нерва оканчиваются билатерально в дорзальных и вентральных кохлеарных ядрах. Волокна второго порядка восходят контралатерально к нижним буграм четверохолмия; волокна от вентральных кохлеарных ядер также дают коллатерали билатерально в ядра верхних олив. Следующее билатеральное взаимодействие обеспечивается на уровне нижних бугров четверохолмия. Затем волокна восходят к ядрам медиального коленчатого тела таламуса, а оттуда направляются в слуховую кору.

Fig. 18.18. Central Auditory Pathways shown schematically on transverse sections of the medulla, midbrain, and thalamus, and a coronal section of the cerebral cortex. Auditory nerve fibers end in the dorsal and ventral cochlear nuclei. Second-order fibers ascend to the contralateral inferior colliculus; those from the ventral cochlear nucleus also supply collaterals bilaterally to the superior olivary nuclei. Further bilateral interaction occurs at the level of the inferior colliculus. Fibers then ascend to the medial geniculate nucleus of the thalamus and hence to the auditory cortex. (After Berne and Levy, 1988.)

соответствует обострению пространственной локализации колебаний на базилярной мембране и обеспечивается за счет латерального торможения, точно так же как и в соматосенсорной системе. Таким образом, рецептивным полем этого коркового нейрона является возбужденная полоса базилярной мембраны, окруженная с обеих сторон тормозным окаймлением. Это приводит к сужению диапазона частот, которые возбуждают клетку, за счет сжатия его с обеих сторон более высокими и более низкими частотами, которые вызывают торможение (рис. 18.19В). Тормозные боковые полосы частот обусловлены частично нисходящей обратной связью из самой коры, которая формирует свойства ответа клеток, расположенных на более низких уровнях[99].

Слуховая кора

Слуховой вход, осуществляемый как через дорзальные, так и вентральные кохлеарные ядра, достигает слуховой коры. **Первичная слуховая кора** (A_1) расположена в верхнем отделе височной доли и соответствует полям 41 и 42 по Бродману. У кошек A_1 удобно расположена на боковой поверхности мозга, поэтому большинство комбинированных анатомо-физиологических исследований производится на этом виде[100]. Микроэлектродные исследования показали, что A_1 также имеет колончатую организацию, при которой все клетки, расположенные вдоль вертикального пути, имеют одну и ту же оптимальную частоту[101)–103]. Фактически A1 организована в виде изочастотных полос или пластин коры, идущих перпендикулярно к тонотопической оси.

Слуховая кора у обезьян содержит три полных кохлеотопических карты с параллельными проекциями из ядер медиального коленчатого тела на все эти области. Самая задняя из них соответствует первичной слуховой коре, как показано на основе ее гистологических свойств[104]. Эта центральная основа окружена вторичными слуховыми областями, кото-

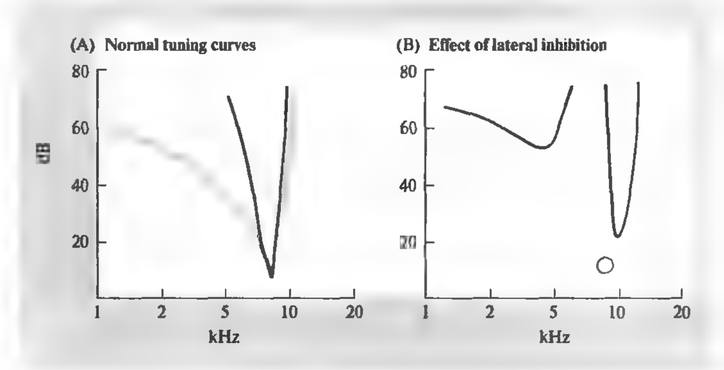


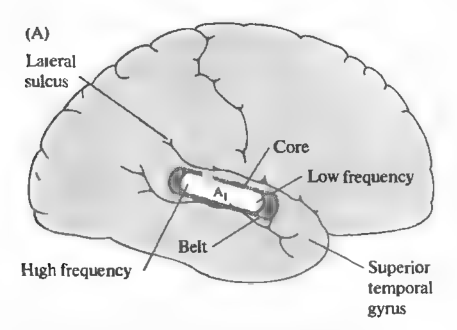
Рис. 18.19. Латеральное торможение нейронов в слуховой коре. (A) Кривая настройки для нейрона в слуховой коре кошки (черная линия). Оптимальная частота примерно 7 кГц. Для сравнения, светлой линией показана более широкая кривая настройки волокна слухового нерва с той же оптимальной частотой (см. рис. 18.12). (B) Латеральное торможение того же самого коркового нейрона. Ответ возникает на продолжительный чистый тон оптимальной частоты (показан кружком); затем добавлен дополнительный тон, который тормозит ответ на оптимальную частоту. Кривые показывают звуковое давление, которое должен иметь дополнительный тон для того, чтобы уменьшить ответ на 20 %, определяя, таким образом, область окружающего торможения.

Fig. 18.19. Lateral Inhibition of a Neuron in the Auditory Cortex. (A) Tuning curve for a neuron in the auditory cortex of a cat (black line). The best frequency is about 7 kHz. The light line shows, for comparison, the broader tuning curve of a mammalian auditory nerve fiber with the same best frequency (see Figure 18.12). (B) Lateral inhibition of the same cortical neuron. A response is produced by a continuous tone at the best frequency (open circle); an additional tone is then added, which inhibits the best-frequency response. Curves indicate the sound pressure required for the additional tone to reduce the response by 20 %, thereby defining the area of surround inhibition. (After Arthur, Pfeiffer, and Suga, 1971.)

рые соединены не только с первичной корой, но также и с подразделами ядер медиального коленчатого тела. Таким образом, в слуховой коре происходит как последовательная, так и параллельная обработка[105)]. Исследования с помощью электроэнцефалографического картирования и функционального магнитного резонанса представляют доказательства подобной же организации слуховой коры у человека[106, 107)], и эта область коры активирована даже во время чтения по губам![108)]

По аналогии с другими сенсорными участками коры можно ожидать, что кохлеотопическая карта A_1 будет подразделена на различные функциональные зоны. Если двигать электрод вдоль изочастотной полоски, большинство клеток либо возбуждаются звуком, воспринимаемым любым из ушей (EE), либо возбуждаются из одного уха и тормозятся из другого (EI) (рис. 18.20B). Эта бинауральная чувствительность закономерно меняется, и полагают, что ее значения образуют полосы, идущие под прямым углом к изочастотным контурам[109)]. Существуют также некоторые доказательства закономерных изменений кодирования интенсивности и ширины полосы в A_1[110)–112)]. Организация EE—EI может быть выведена из бинауральных взаимодействий, которые сначала возникают в ядрах олив (см. следующий раздел), и приводит к предположению, что A_1 также картирована для слухового пространства, хотя в настоящее время это не доказано.

Обработка слуховых сигналов сложна[113)]. Важные с точки зрения поведения звуки должны быть извлечены из обширного и многообразного акустического окружения[114)]. Не только частотный состав, но также и временная последовательность входов должна быть проанализирована каким-то образом[115)] (например, проигрывание магнитофонной записи человеческой речи в обратную сторону воспринимается как тарабарщина). Кроме того, такая обработка у любого вида животных должна иметь дело не только с анализом окружающих звуков, но также со способами извлечения звука разными видами. У людей основные элементы речи, называемые **фонемами**, одинаковы для всех языков и являются звуками, которые первыми лопочут дети, прежде чем какие-то конкретные звуки будут выбраны, чтобы сочетать их в слова[116)]. Базовые звуки могут быть проанализированы как комбинации частотно-временных отношений, например, продолжительный компонент на 1 000 Гц сопровождается вторым, частотно-модулированным компонентом, начинающимся с 5 000 Гц и быстро снижаю-



(B) A_I

			I13
		I11	
		I11	
E15	I12	I10	E16
E15	I12	I11	
E14	I13	E11	
E14	I12	E10	E10
I14	I13	E10	E6
I12	E13	E10	I6
I11	E11	E10	I6
I13	E11	I10	I6
E13	E11	I10	
E13	E11		E6
E13	I13	E10	E6
E13	I12	E10	E6
E13	O12	E9	
E13	E11	E9	
E13	E10	O9	
E12	E10		
O13	E11	O9	
I13	E11		
I12	E11	E9	
E12	E10	E9	
	I10	E9	
		E9	
E12	I10	E9	
E11	I10	I9	
E12	I10	I9	
I11	E11	I9	
I11			

1 mm
E Excitatory/excitatory (EE)
I Excitatory/inhibitory (EI)
O No interaction (O)

Рис. 18.20. Слуховая кора. (A) Афференты от медиального коленчатого тела, проецированные на область верхней височной извилины мозга обезьяны, показаны здесь так, что боковая борозда развернута к поверхности. Центральная внутренняя область (A_1) тонотопически картирована, обнаруживая низкие частоты в передних участках, а высокие — в задних. В близрасположенной опоясывающей области обнаружены дополнительные тонотопические зоны. (B) С помощью последовательных тангенциальных проходов электродом вдоль изочастотных областей в A_1 у кошки исследованы эффекты монауральной и бинауральной подачи звуков. Для каждой встреченной клетки приведены результаты контралатерального звукового воздействия (E = активация, I = торможение, 0 = отсутствие влияния) и оптимальная частота. Как и ожидалось, оптимальная частота была относительно постоянной для каждого прохода. Однако бинауральные стимулы выявляли выраженные кластеры клеток с усилением, ослаблением или отсутствием влияния на монауральные ответы.

Fig. 18.20. Auditory Cortex. (A) Afferents from the medial geniculate nucleus project to a region of the superior temporal gyrus of the monkey brain, shown here as though the lateral sulcus were spread open. A central core region (A_1) is tonotopically mapped, with low frequencies found anteriorly and high frequencies found posteriorly. Additional tonotopic areas are found in a surrounding belt region. (B) Successive tangential electrode penetrations were made along isofrequency regions of A_1 in a cat, and the effects of binaural versus monaural sound were examined. For each cell encountered, the effect of contralateral sound (E = excitatory; I = inhibitory; 0 = no effect) and best frequency are listed. As expected, the best frequency was relatively constant in any penetration. However, binaural stimulation enhanced (E), inhibited (I), or left unchanged (0) the monaural response, and these effects occurred in clusters. (B modified from Middlebrooks, Dykes, and Merzenich, 1980.)

щимся до 500 Гц. Компоненты называются формантами.

По аналогии со зрительной системой, которая содержит клетки, распознающие разрезы, углы, края и другие геометрические формы (глава 20), мы могли бы ожидать, что обнаружим клетки высокого порядка в слуховой коре человека, которые реагируют на конкретные форманты, или, возможно, фонемы. Этот принцип, действительно, наблюдается у животных. Например, некоторые клетки в слуховой коре усатой летучей мыши реагируют на конкретные комбинации тонов постоянной и модулируемой частот, которые эквивалентны собственным звукам летучей мыши[117]. В то же время, мы могли бы ожидать, что напрасно будет искать клетки, отвечающие за человеческие звуковые элементы в слуховой системе летучей мыши или других млекопитающих. Такие клетки высокого порядка, однако, все же *обнаружены* у птицы рода *Mynah*, которых обучают говорить[118]. Кортикальные механизмы языкового кодирования могут быть обнаружены у таких видов,

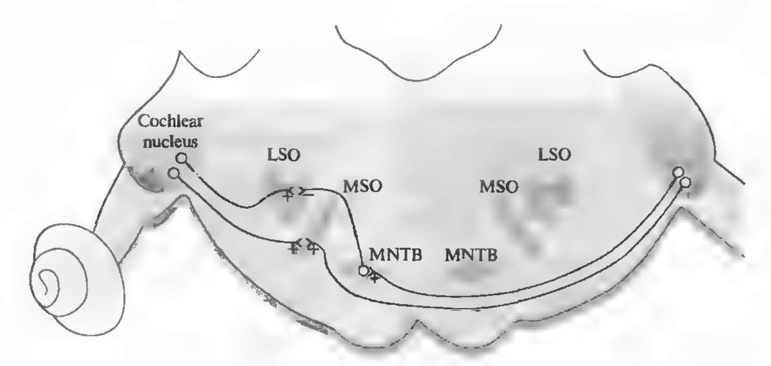


Рис. 18.21. Бинауральные связи в оливарном комплексе. Нейроны вентрального кохлеарного ядра проецированы ипсилатерально в боковую верхнюю оливу (LSO), но контралатерально в среднее ядро трапециевидного тела (MNTB) и в среднюю верхнюю оливу (MSO). Таким образом, нейроны MSO возбуждаются от обоих ушей, а нейроны LSO возбуждаются ипсилатерально, но тормозятся контралатерально за счет вмешательства тормозных интернейронов, расположенных в MNTB.

Fig. 18.21. Binaural Connections in the Olivary Complex. Neurons in the ventral cochlear nucleus project to the ipsilateral lateral superior olive (LSO) but to the contralateral medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) and the contralateral medial superior olive (MSO). Thus, MSO neurons are excited by both ears, and LSO neurons are excited ipsilaterally but inhibited contralaterally by way of the intervening inhibitory interneuron in the MNTB.

как мармозетки, которые используют ограниченный и стереотипный набор призывов («слов») для общения[96].

Локализация звука

Чрезвычайная чувствительность и частотная избирательность слуховой системы была представлена у животных задолго до того, как развилась человеческая речь. В значительной степени тонкости слуховой системы возникли, чтобы улучшить способность организма определять местоположение звука в пространстве. Преимущества этого очевидны: сигналы, передающиеся на большие расстояния как звуковые волны, могут помочь обнаружить хищника или жертву при отсутствии зрительной и другой информации. Однако, в отличие от зрительной или соматосенсорной систем, звуковой нейроэпителий не может быть использован для кодирования места (локации), поскольку он приспособлен для тонотопического картирования. Вместо этого направление звука вычисляется на основе бинаурального сравнения временного хода и интенсивности сигналов, которое производится в центральной слуховой системе. Слуховой проводящий путь, поэтому, сложен и включает в себя многочисленные подкорковые синаптические переключения и многочисленные перекрещивания почти на каждом уровне.

Дорзальное кохлеарное ядро в основном предназначено для монаурального частотного анализа[119] и обеспечивает относительно прямую, тонотопически организованную проекцию на контралатеральную область A_1. Напротив, нейроны второго порядка в **вентральном кохлеарном ядре** проецируются как ипсилатерально, так и контралатерально на комплекс верхних олив в стволе мозга. Большинство нейронов в медиальной верхней оливе (MSO) возбуждаются стимуляцией любого из ушей (и, таким образом, соотносятся с ЕЕ-нейронами, см. рис. 18.21), но реагируют лучше всего, когда тон подается на оба уха с характерной задержкой, соответствующей достижению сначала одного уха, потом другого. Скорость звука в воздухе составляет 340 м/с, так что максимальная временная разница, создаваемая человеческой головой (около 18 см в диаметре), составляет 0,5 мс для звука, приходящего вдоль оси между обоими ушами, и значительно меньшие задержки для звуков, приходящих спереди. В дополнение к разнице во времени прибытия, постоянный источник звука вызывает фазовый сдвиг между двумя ушами.

Клетки **латеральной верхней оливы** (LSO) получают возбуждение ипсилатерального вентрального кохлеарного ядра (рис. 18.21). Клетки в контралатеральном вентральном кохлеарном ядре проецируются на противоположную сторону и образуют синапсы на медиальном ядре трапециевидного тела (MNTB). Клетки MNTB тормозят нейроны в LSO.

Таким образом, нейроны в LSO возбуждаются ипсилатеральным и подавляются контралатеральным звуком (EI). Такое взаимодействие может быть полезным для выявления различий в интенсивности звука в двух ушах. На высоких частотах обнаруживается 10-кратная разница в частоте, для которой голова служит как эффективное затенение звука.

Различия как по фазе, так и по интенсивности изменяются как функция частоты. Для головы человека разница по фазе значительна на частотах ниже 2 кГц, тогда как отличия по интенсивности становятся более существенными на более высоких частотах. Психофизические исследования показали, что локализация осуществляется сопоставлением различий между двумя ушами по времени прихода сигнала и/или интенсивности входящего звука[120, 121]. Таким образом, если подаются щелчки через наушники с различными задержками, звук локализуется по направлению к уху, к которому он приходит раньше. Если щелчки подаются одновременно, но с разной интенсивностью, то звук локализуется с той стороны, где щелчок громче. Фактически сигналы локализации зависят в точности от частотного содержания. Голова и внешнее ухо отфильтровывают специфические компоненты частоты, в зависимости от места в пространстве, откуда исходит звук[122]. Эти **спектральные метки** являются важными сигналами, которые используются для локализации звука[123, 124]. Люди могут различать интерауральную временную разницу всего в 5 мкс — очень высокое разрешение, если учесть, что длительность потенциала действия составляет примерно 1 мс; это показывает важность точной временной организации для слуховых функций.

Выводы

- Соматосенсорные рецепторы в коже отвечают на разнообразные стимулы, такие как прикосновение, давление, вибрация и перемена температуры. Рецепторы различаются по скорости адаптации и по размеру рецептивного поля.
- Адаптация сенсорных ответов зависит от механических свойств вспомогательных структур и от изменений в возбудимости. Быстро адаптирующиеся рецепторы «настроены» на более высокочастотную стимуляцию.
- Центральные соматосенсорные проводящие пути соматотопически картированы. Соматотопическая карта коры подразделена на функциональные области, отражающие специфичность стимула периферических рецепторов.
- Рецептивные поля нейронов в соматосенсорной коре организованы по принципу «центр — окружение».
- Механическая настройка базилярной мембраны у млекопитающих обеспечивает частотную избирательность ответов слуховых афферентов. Потенциалзависимая подвижность внешних волосковых клеток вносит вклад в акустическую чувствительность улитки млекопитающих.
- Электрическая настройка обеспечивает избирательность волосковых клеток низших позвоночных. Взаимодействие потенциалзависимых кальциевых каналов с кальций-активируемыми калиевыми каналами приводит к усилению ответа мембранного потенциала на частоте, равной характеристической частоте звука для каждой волосковой клетки.
- Волосковые клетки улитки подвергаются эфферентному торможению холинергическими нейронами ствола мозга. Эфферентное торможение изменяет чувствительность и настройку афферентов улитки.
- Центральные слуховые проводящие пути, включая кору, тонотопически картированы. Свойства ответов клеток в слуховой коре сложны и включают бинауральные взаимодействия и зависимость от временных комбинаций тонов.
- Бинауральные комбинации интенсивности и временных параметров звука используются для того, чтобы вычислять местоположение источника звука в пространстве. Эти вычисления выполняются синаптическими связями в ядрах верхней оливы.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Fettiplace, R., and Fuchs, P. A. 1999. Mechanisms of hair cell tuning. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 809–834.
- Kaas, J. H., Hackett, T. A., and Tramo, M. J. 1999. Auditory processing in primate cerebral cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 164–170.
- Mountcastle, V. B. 1995. The parietal system and some higher brain functions. *Cerebral Cortex* 5: 377–390.
- Mountcastle, V. B. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120: 701–722.
- Patuzzi, R. 1996. Cochlear micromechanics and macromechanics. In P. Dallos, A. N. Popper, and R. R. Fay (eds.), *The Cochlea*. Springer, New York, pp. 186–257.
- Perl, E. R. 1996. Cutaneous polymodal receptors: Characteristics and plasticity. *Prog. Brain Res.* 113: 21–37.
- von Bekesy, G. 1960. *Experiments in Hearing.* McGraw-Hill, New York.
- Willis, W. D., and Westlund, K. N. 1997. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J. Clin. Neurophysiol.* 14: 2–31.

Статьи

- Art, J. J., and Fettiplace, R. 1987. Variation of membrane properties in hair cells isolated from the turtle cochlea. *J. Physiol.* 385: 207–242.
- Art, J. J., Fettiplace, R., and Fuchs, P. A. 1984. Synaptic hyperpolarisation and inhibition of turtle cochlea hair cells. *J. Physlol.* 356: 525–550.
- Ashmore, J. F. 1987. A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: The cellular basis of the cochlear amplifier. *J. Physiol.* 388: 323–347.
- Crawford, A. C., and Fettiplace, R. 1981. An electrical tuning mechanism in turtle cochlear hair cells. *J. Physiol.* 312: 377–412.
- Harris, J. A., Petersen, R. S., and Diamond, M. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7587–7591.
- Hudspeth, A. J., and Lewis, R. S. 1988. Kinetic analysis of voltage- and ion-dependent conductances in saccular hair cells of the bull-frog, Rana catesbeiana. *J. Physiol.* 400: 237–274.
- Johansson, R. S., and Vallbo, A. B. 1979. Detection of tactile stimuli. Thresholds of afferent units related to psychophysical thresholds in the human hand. *J. Physiol.* 297: 405–422.
- Middlebrooks, J. C., Dykes, R. W., and Merzenich, M. M. 1980. Binaural response-specific bands in primary auditory cortex (AI) of the cat: Topographical organization orthogonal to isofrequency contours. *Brain Res.* 181: 31–48.
- Mountcastle, V. B. 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J. Neurophysiol.* 20: 408–434.
- Nelken, I., Rotman, Y., and Bar Yosef, O. 1999. Responses of auditory cortex neurons to structural features of natural sounds. *Nature* 397: 154–157.
- Pons, T. P., Garraghty, P. E., and Mishkin, M. 1987. Physiological evidence for serial processing in somatosensory cortex. *Science* 237: 417–420.
- Winslow, R. L., and Sachs, M. B. 1987. Effect of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on auditory nerve response to tones in noise. *J. Neurophysiol.* 57: 1002–1021.

Цитированная литература

1. Johansson, R. S., and Vallbo, A. B. 1979. *J. Physiol.* 297: 405–422.
2. Vallbo, A. B., and Hagbarth, K.-E. 1968. *Exp. Neurol.* 21: 270–289.
3. Iggo, A. 1974. In *The Peripheral Nervous System.* Plenum, New York, pp. 347–404.
4. LaMotte, R. H., and Mountcastle, V. B. 1975. *J. Neurophysiol.* 38: 539–559.
5. Johnson, K. O., Hsiao, S. S., and Twombly, I. A. 1995. In *The Cognitive Sciences.* MIT Press, Cambridge, MA, pp. 253–268.
6. Hsiao, S. S., Johnson, K. O., and Twombly, I. A. 1993. *Acta Psychol. (Amst.)* 84: 53–67.
7. Brisben, A. J., Hsiao, S. S., and Johnson, K. O. 1999. *J. Neurophysiol.* 81: 1548–1558.
8. Penfield, W., and Rasmussen, T. 1950. *The Cerebral Cortex of Man: A Clinical Study of Localization of Function.* Macmillan, New York.
9. Woolsey, C. N. 1958. In *The Biological and Biochemical Bases of Behavior.* University of Wisconsin Press, Madison, p. 63–82.
10. Rasmusson, D. D. 1982. *J. Comp. Neurol.* 205: 313–326.
11. Krubitzer, L., et al. 1995. *J. Comp. Neurol.* 351: 261–306.
12. Elbert, T., et al. 1995. *Science* 270: 305–307.
13. Xerri, C., et al. 1999. *Cerebral Cortex* 9: 264–276.
14. Mountcastle, V. B. 1957. *J. Neurophysiol.* 20: 408–434.
15. Powell, T. P. S., and Mountcastle, V. B. 1959. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 105: 133–162.

16. Mountcastle, V. B. 1997. *Brain* 120: 701–722.
17. Tanji, J., and Wise, S. P. 1981. *J. Neurophys.* 45: 467–481.
18. Woolsey, T. A., and Van der Loos, H. 1970. *Broin Res.* 17: 205–242.
19. Van der Loos, H., and Woolsey, T. A. 1973. *Science* 179: 395–398.
20. Bina, K. G., Park, M., and O'Dowd, D. K. 1998. *J. Comp. Neurol.* 397: 1–9.
21. Gierdalski, M., et al. 1999. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71: 111–119.
22. Welker, C. 1976. *J. Comp. Neurol.* 166: 173–190.
23. Simons, D. J., and Woolsey, T. A. 1979. *Brain Res.* 165: 327–332.
24. Harris, J. A., Petersen, R. S., and Diamond, M. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7587–7591.
25. Iwamura, U., et al. 1993. *Exp. Brain Res.* 92: 360–368.
26. Kaas, J. H. 1993. *Ann. Anat.* 175: 509–518.
27. Pons, T. P., Garraghty, P. E., and Mishkin, M. 1987. *Science* 237: 417–420.
28. Pons, T. P., Garraghty, P. E., and Mishkin, M. 1992. *J. Neurophysiol.* 68: 518–527.
29. Turman, A. B., et al. 1992. *J. Neurophysiol.* 67: 411–429.
30. Jiang, W., Tremblay, F., and Chapman, C. E. 1997. *J. Neurophysiol.* 77: 1656–1662.
31. Whitsel, B. L., Petrucelli, L. M., and Werner, G. 1969. *J. Neurophysiol.* 32: 170–183.
32. Perl, E. R. 1996. *Prog. Brain Res.* 113: 21–37.
33. Collins, W. F., Jr., Nelson, F. E., and Randt, C. T. 1960. *Arch. Neurol.* 3: 381–385.
34. Konietzny, F., et al. 1981. *Exp. Brain Res.* 42: 219–222.
35. Torebjork, H. E., and Hallin, R. G. 1973. *Exp. Brain Res.* 16: 321–332.
36. Ochoa, J., and Torebjork, E. 1989. *J. Physiol.* 415: 583–599.
37. von Economo, G., and Koskinas, G. N. 1925. *Die Cytoarchitecktonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen.* Julius Springer, Heidelberg.
38. Willis, W. D., and Westlund, K. N. 1997. *J. Clin. Neurophysiol.* 14: 2–31.
39. Poggio, G. F., and Mountcastle, V. B. 1960. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 106: 266–316.
40. Melzack, R., and Wall, P. D. 1965. *Science* 150: 971–979.
41. Hughes, J. (ed.). 1983. *Br. Med. Bull.* 39: 1–106.
42. Basbaum, A. I., and Fields, H. L. 1979. *J. Comp. Neurol.* 187: 513–522.
43. Fields, H. L., and Besson, J-M. (eds.). Pain Modulation Issue. 1988. *Prog. Brain Res.* 77.
44. Fields, H. L. 1987. *Pain.* McGraw-Hill, New York.
45. Fields, H. L., and Basbaum, A. I. 1978. *Annu. Rev. Physiol.* 40: 217–248.
46. Huxley, A. 1928. *Point Counter Point.* Harper Collins, New York, Chapter 3.
47. Bosher, S. K., and Warrren, R. L. 1978. *Nature* 273: 377–378.
48. Anniko, M., and Wroblewski, R. 1986. *Hear. Res.* 22: 279–293.
49. Spoendlin, H. 1972. *Acta Otolaryngol.* 73: 235–248.
50. Kiang, N. Y., et al. 1982. *Science* 217: 175–177.
51. Brown, M. C. 1987. *J. Comp. Neurol.* 260: 591–604.
52. Warr, W. B. 1975. *J. Comp. Neurol.* 161: 159–182.
53. von Bekesy, G. 1960. *Experiments in Hearing.* McGraw-Hill, New York.
54. Rasmussen, G. L. 1946. *J. Comp. Neurol.* 84: 141–220.
55. Galambos, R. 1956. *J. Neurophysiol.* 19: 424–437.
56. Jasser, A., and Guth, P. S. 1973. *J. Neurochem.* 20: 45–53.
57. Winslow, R. L., and Sachs, M. B. 1987. *J. Neurophysiol.* 57: 1002–1021.
58. Liberman, M. C. 1988. *J. Neurophysiol.* 60: 1779–1798.
59. Robertson, D., Anderson, C-J., and Cole, K. S. 1987. *Hear. Res.* 25: 69–76.
60. Liberman, M. C., and Brown, M. C. 1986. *Hear. Res.* 24: 17–36.
61. Wiederhold, M. L., and Kiang, N. Y. S. 1970 *J. Acoust. Soc. Am.* 48: 950–965.
62. Rajan, R. 1995. *J. Neurophysiol.* 74: 598–615.
63. Maison, S. F. and Liberman, M. C. 2000. *J. Neurosci.* 20: 4701–4707.
64. Art, J. J., Fettiplace, R., and Fuchs, P. A. 1984. *J. Physiol.* 356: 525–550.
65. Art, J. J., et al. 1985. *J. Physiol.* 360: 397–421.
66. Fuchs, P. A., and Murrow, B. W. 1992. *J. Neurosci.* 12: 800–809.
67. Martin, A. R., and Fuchs, P. A. 1992. *Proc. R. Soc. Lond. B* 250: 71–76.
68. Housley, G., and Ashmore, J. 1991. *Proc. R. Soc. Lond. B* 244: 161–167.
69. Blanchet, C., et al. 1996. *J. Neurosci.* 16: 2574–2584.
70. Evans, M. 1996. *J. Physiol.* 491: 563–578.
71. Elgoyhen, A. B., et al. 1994. *Cell* 79: 705–715.
72. Glowatzki, E., et al. 1995. *Proc. R. Soc. Lond. B* 262: 141–147.
73. Park, H-J., Niedzielski, A. S., and Wenthold, R. J 1997. *Hear. Res.* 112: 95–105.
74. Brownell, W. E., et al. 1985. *Science* 227: 194–196.
75. Ashmore, J. F. 1987. *J. Physiol.* 388: 323–347.
76. Hallworth, R., Evans, B. N., and Dallos, P. 1993. *J. Neurophysiol.* 70: 549–558.
77. Geleoc, G. S., et al. 1999. *Nature Neurosci.* 2: 713–719.
78. Zheng, J., et al. 2000. *Nature* 405: 149–55.
79. Patuzzi, R. 1996. In *The Cochlea.* Springer, New York, p. 186–257.

80. Crawford, A. C., and Fettiplace, R. 1981. *J. Physiol.* 312: 377–412.
81. Lewis, R. S., and Hudspeth, A. J. 1983. *Nature* 304: 538–541.
82. Hudspeth, A. J., and Lewis, R. S. 1988. *J. Physiol.* 400: 237–274.
83. Art, J. J., and Fettiplace, R. 1987. *J. Physiol.* 385: 207–242.
84. Art, J. J., Fettiplace, R., and Wu, Y-C. 1995. *J. Gen. Physiol.* 105: 49–72.
85. Goodman, M., and Art, J. J. 1996. *J. Physiol.* 497: 395–412.
86. Jiang, G-J., et al. 1997. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264: 731–737.
87. Jones, E. M. C., Laus, C., and Fettiplace, R. 1998. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 685–692.
88. Navaratnam, D. S., et al. 1997. *Neuron* 19: 1077–1085.
89. Rosenblatt, K. P., et al. 1997. *Neuron* 19: 1061–1075.
90. Jones, E. M. C., Gray-Keller, M., and Fettiplace, R. 1999. *J. Physiol.* 518: 653–665.
91. Ramanathan, K., et al. 1999. *Science* 283: 215–217.
92. Fekete, D. M., et al. 1984. *J. Comp. Neurol.* 229: 432–450.
93. Young, E. D. 1984. In *Hearing Science*. College-Hill Press, San Diego, CA, p. 423–460.
94. Ramachandran, R., Davis, K. A., and May, B. J. 1999. *J. Neurophysiol.* 82: 152–163.
95. Shamma, S. A., et al. 1993. *J. Neurophysiol.* 69: 367–383.
96. Wang, X., et al. 1995. *J. Neurophysiol.* 74: 2685–2706.
97. Rauschecker, J. P. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 516–521.
98. Arthur, R. M., Pfeiffer, R. R., and Suga, N. 1971. *J. Physiol.* 212: 593–609.
99. Suga, N., Zhang, Y., and Yan, J. 1997. *J. Neurophysiol.* 77: 2098–2114.
100. Woolsey, C. N. 1972. In *Physiology of the Auditory System*. National Educational Consultants, Baltimore, MD, p. 271–282.
101. Merzenich, M. M., and Brugge, J. F. 1973. *Broin Res.* 50: 275–296.
102. Merzenich, M. M., Knight, P. L., and Roth, G. L. 1975. *J. Neurophysiol.* 38: 231–249.
103. Reale, R. A., and Imig, T. J. 1980. *J. Comp. Neurol.* 192: 265–291.
104. Kaas, J. H., Hackett, T. A., and Tramo, M. J. 1999. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 164–170.
105. Rauschecker, J. P., et al. 1997. *J. Comp. Neurol.* 382: 89–103.
106. Romani, G. L., Williamson, S. J., and Kaufman, L. 1982. *Science* 216: 1339–1340.
107. Pantev, C., et al. 1995. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 94: 26–40.
108. Calvert, G. A., et al. 1997. *Science* 276: 593–596.
109. Middlebrooks, J. C., Dykes, R. W., and Merzenich, M. M. 1980. *Brain Res.* 181: 31–48.
110. Sutter, M. L., and Schreiner, C. E. 1995. *J. Neurophysiol.* 73: 190–204.
111. Hiel, P., Rajan, R., and Irvine, D. 1994. *Hear. Res.* 76: 188–202.
112. Clarey, J. C., Barone, P., and Imig, T. J. 1994. *J. Neurophysiol.* 72: 2383–2405.
113. Sachs, M. B. 1984. *Annu. Rev. Physiol.* 46: 261–273.
114. Nelken, I., Rotman, Y., and Bar Yosef, O. 1999. *Noture* 397: 154–157.
115. Griffiths, T. D., et al. 1998. *Nature Neurosci.* 1: 422–427.
116. De Boysson-Bardies, B., et al. 1989. *J. Child Lang.* 16: 1–17.
117. Tsuzuki, K., and Suga, N. 1988. *J. Neurophysiol.* 60: 1908–1923.
118. Langer, G., Bronke, D., and Scheich, H. 1981. *Exp. Brain Res.* 43: 11–24.
119. Young, E. D., et al. 1992. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 336: 407–413.
120. Blauert, J. 1982. *Scand. Audiol. Suppl.* 15: 7–26.
121. Buell, T. N., and Hafter, E. R. 1988. *J. Acoust. Soc. Am.* 84: 2063–2066.
122. Rice, J. J., et al. 1992. *Hear. Res.* 58: 132–152.
123. May, B. J., and Huang, A. Y. 1996. *J. Acoust. Soc. Am.* 100: 1059–1069.
124. Huang, A. Y., and May, B. J. 1996. *J. Acoust. Soc. Am.* 100: 1070–1080.

Глава 19

Передача и кодирование сигнала в сетчатке глаза

Путь нервных импульсов, возбуждаемых светом и позволяющих нам воспринимать окружающие нас объекты, фон, движение, тени и цвета, начинается на сетчатке. Свет воспринимается специальными фоторецепторами, *колбочками и палочками*, содержащими зрительные пигменты. Палочки высокочувствительны и способны уловить даже один квант света. Цветовое дневное зрение осуществляется колбочками. Поглощение света зрительным пигментом фоторецептора активирует G-белок, запускающий каскад биохимических реакций. В результате происходит закрытие управляемого нуклеотидами ионного канала, расположенного на мембране фоторецепторной клетки, что приводит к ее гиперполяризации. Таким образом, при действии света происходит уменьшение высвобождения медиатора в синапсах между фоторецепторами и биполярными клетками, а также между фоторецепторами и горизонтальными клетками. Сигналы от фоторецепторов достигают в конечном итоге ганглиозных клеток, аксоны которых проходят в составе зрительного нерва и являются единственными нервными волокнами, несущими зрительную информацию в мозг.

Соединения между рецепторами и ганглиозными клетками обеспечиваются биполярными, горизонтальными и амакриновыми клетками. Подобно палочкам и колбочками, биполярные и горизонтальные клетки генерируют сигналы в виде локальных ответов, а не потенциалов действия. Кодирование зрительных сигналов в сетчатке и на последующих уровнях зрительного анализатора можно лучше всего изучить при помощи анализа нейронных механизмов функционирования рецептивных полей, являющихся элементарными блоками, из которых строится система восприятия зрительных образов. Рецептивным полем нейрона зрительного анализатора называется определенная зона сетчатки, при освещении которой изменяется (увеличивается или уменьшается) активность этого нейрона. Рецептивным полем ганглиозной клетки сетчатки является небольшая округлая область сетчатки. Потенциалы действия возникают в ганглиозных "on"-клетках, воспринимающих маленькие пятна света, расположенные в центре темного поля, и в ганглиозных "off"-клетках, воспринимающих темные пятна на освещенном фоне. Эти две группы ганглиозных клеток имеют большое значение в работе сетчатки. Называемые мелкоклеточными (parvocellular, P) и крупноклеточными (magnocellular, M), они имеют разные размеры, расположение, связи и физиологические ответы. Более мелкие P клетки способны к высокоточной пространственной дискриминации и способны различать различные цвета. Большие по размеру M клетки способны воспринимать подвижные объекты, а также чувствительны к малейшим изменениям контрастности. Эти свойства M и P групп клеток передаются по нервным связям на дальнейшие уровни зрительного анализатора, вплоть до уровня сознания.

В данной главе даются лишь основы, необходимые для дальнейшего анализа структуры и функции церебральной коры в последующих главах 20 и 21. Свойства нейронов сетчатки описываются здесь подробнее, чем в главе 1, где они только использовались в качестве иллюстраций принципов организации и передачи сигнала. В последние годы появилось огромное количество работ по психофизиологическим аспектам зрения, цветовому зрению, темновой адаптации, пигментам сетчатки, передаче сигнала в сетчатке, медиаторам и структурной организации сетчатки. По каждой из этих проблем имеется отдельная библиография (см. раздел «Рекомендуемая литература» в конце этой главы). Появилось также большое количество работ о сравнении свойств зрительных анализаторов у беспозвоночных и низших позвоночных, а также млекопитающих. Ввиду того, что детальный обзор всех этих проблем не может быть выполнен в рамках данной книги, нами были выбраны наиболее показательные эксперименты, иллюстрирующие фундаментальные принципы работы зрительного анализатора: от отдельного нейрона до механизмов восприятия.

§ 1. Глаз

Глаз — автономный аванпост головного мозга. Он собирает информацию, анализирует и передает ее для дальнейшего анализа в высшие центры по строго определенному пути (зрительному нерву). Первым шагом здесь является получение перевернутого изображения окружающего мира на сетчатке. Неотъемлемыми условиями четкого зрения являются: (1) фокусирование изображения на сетчатке путем изменения толщины хрусталика (аккомодация); (2) регуляция зрачком количества света, падающего на сетчатку; (3) конвергенция информации от обоих глаз для того, чтобы изображения на сетчатках обоих глаз располагались в соответствующих зонах. Наше зрение сильно зависит от области зрительного поля, на которое проецируется изображение. Мы способны читать мелкий текст, расположенный прямо перед глазами и проецирующийся в центр сетчатки, но не куда-то в периферическую зону. Падение остроты зрения возникает из-за различных способов анализа получаемой зрительной информации в разных зонах, а не из-за нерезкого изображения или оптических аномалий вне центральной зоны. Сначала мы познакомимся с принципиальными анатомическими особенностями пути зрительного анализатора, а затем шаг за шагом рассмотрим, каким образом возникает сигнал на сетчатке при улавливании света зрительными пигментами и передается затем далее по зрительному пути.

Анатомия проводящих путей зрительного анализатора

Путь зрительного анализатора, начинающийся от глаза и идущий до коры головного мозга, показан на рис. 19.1, где изображены основные ключевые пункты зрительной системы. Волокна зрительного нерва начинаются от ганглиозных клеток сетчатки и заканчиваются в слое клеток таламуса, в области латерального коленчатого тела, где расположены вторые нейроны цепочки зрительного тракта. Аксоны нейронов коленчатого тела, в свою очередь, проходят через зрительную лучистость в кору головного мозга (глава 20). С этого этапа распространение зрительной информации происходит еще более сложным путем, проследить который пока не представляется возможным.

На рис. 19.1 показано, как волокна, идущие от каждой сетчатки, разделяются на два пучка в области зрительного перекреста, откуда они идут в латеральное коленчатое ядро и зрительную кору обоих полушарий. Правые стороны сетчатки обоих глаз посылают волокна в правое полушарие. Из-за того, что изображение переворачивается, проходя через зрачок, получается, что на правую сторону каждой сетчатки проецируется изображения окружающего мира с левой стороны от животного. Таким образом, каждое полушарие «видит» зрительное поле противоположной стороны. Соответственно, люди с повреждением левого полушария из-за травмы или заболевания становятся «слепыми» на правое

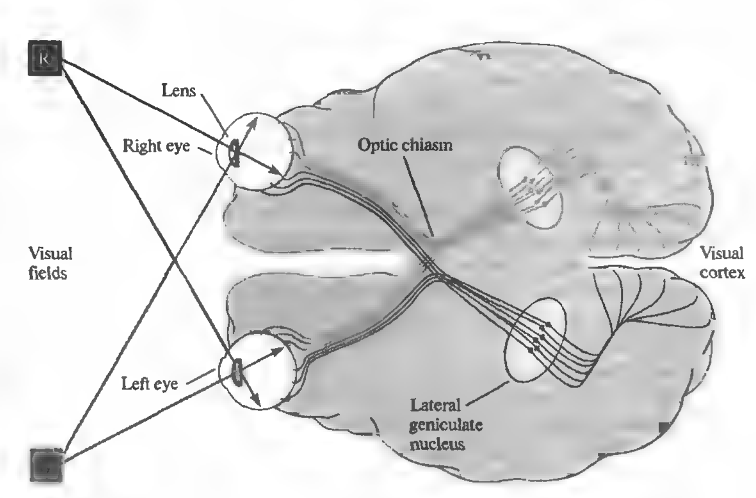


Рис. 19.1. Путь зрительного анализатора. Правая сторона сетчатки каждого глаза, показанная серым цветом, посылает сигналы к правому латеральному коленчатому телу. Таким образом, зрительный центр правого полушария получает информацию исключительно о левой части зрительного поля.

Fig. 19.1. Visual Pathways. The right side of each retina (shown in grey) projects to the right lateral geniculate nucleus. Thus, the right visual cortex receives information exclusively from the left half of the visual field.

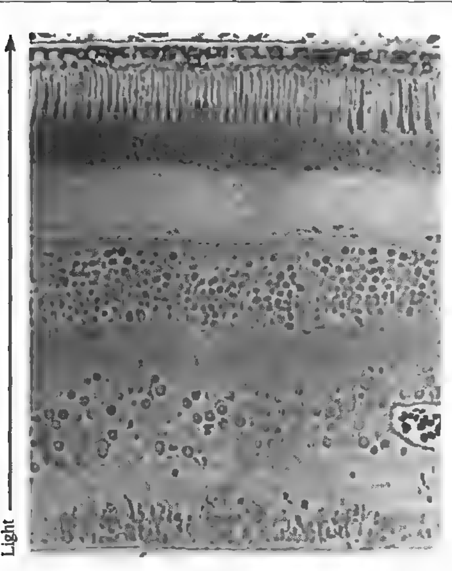


Рис. 19.2. Поперечный срез сетчатки челоаека, на котором представлено 5 основных клеточных типов, организованных в морфологические слои сетчатки. Свет падает на сетчатку и достигает палочек и колбочек, где поглощается, возбуждая сигналы в наружных сегментах фоторецепторов. Синапсы между клетками располагаются а наружном и внутреннем сетчатом слое.

Fig. 19.2. Section through a Human Retina showing the five principal cell types arranged in layers. Light enters the retina and reaches the rods and cones, where it is absorbed, initiating signals in the outer segments. Synaptic connections are made in the outer and inner plexiform layers. (From Boycott and Dowling, 1969.)

зрительное поле и наоборот. Другие пути, направляющиеся в средний мозг, здесь не описываются. У высших позвоночных их функции заключаются исключительно в регуляции движения глазного яблока и аккомодапии.

Конвергенция и дивергенция связей

При исследовании строения клеток различных структур зрительного тракта становится очевидным, что зрительная информация не просто передается неизменной с уровня на уровень, а анализируется и обрабатывается по пути в головной мозг. Нейроны значительио дивергируют и конвергируют на каждом этапе; это означает, что каждая клетка получает и передает сигналы множеству других клеток. Например, в глазу человека содержится около 100 миллионов первичных рецепторов (палочек и колбочек). Но от ганглиозных клеток в головной мозг в составе зрительного нерва проходит всего около 1 миллиона волокон. Тот же принцип сохраняется в глазу обезьян и кошек: значительное уменьшение числа клеток при передаче сигнала от рецепторов на нейроны. Таким образом, в глазу происходит как бы пропускание информации через воронку (funneling). Отдельные нейроны, получающие сигналы от большого количества нервных терминалей конвергирующих на них волокон, не способны по-особому реагировать на каждый из сигналов. Вместо этого конвергирующие импульсы из многих источников интегрируются на каждом этапе в абсолютно новую информацию, содержащую некоторые данные о каждом из сигналов. После выхода из сетчатки аксон каждой ганглиозной клетки переключается на клетках коленчатого ядра.

§ 2. Сетчатка

Слои сетчатки

Что делает сетчатку особенно привлекательной для физиологических исследований, так это четкое ее разделение на слои и стереотипная морфология небольшого (всего 5 основных классов) числа клеточных типов[1, 2]. Организация и типичное расположение различных клеток показано на рис. 19.2, где представлен поперечный срез сетчатки человека, подобный тому, что показан на рис. 19.2. В самом глубоком от поверхности слое, на максимальном удалении от проникающего в глаз света, расположены **палочки и колбочки**, которые отвечают за ночное и дневное зрение соответственно. Они соединены с **биполярными клетками**, которые, в свою очередь, соединяются с **ганглиозными клетками**, а последние образуют волокна зрительного нерва.

Кроме этой центральной последовательности клеток имеются также и другие клетки, образующие в основном латеральные соединения клеток одного уровня друг с другом.

Таковыми являются **горизонтальные** и **амакриновые клетки**. Только амакриновые и ганглиозные клетки способны отвечать потенциалом действия и передавать его на другие клетки. Фоторецепторы, горизонтальные и биполярные клетки отвечают только локальным ответом переменной амплитуды. Внутри каждого из этих основных классов имеются подгруппы, отличающиеся друг от друга по строению и функциям. мюллеровские клетки, свойства которых описываются в главе 8, являются глиальными клетками сетчатки.

Палочки и колбочки

Фоторецепторы являются теми образованиями, которые позволяют нам *видеть* окружающий мир, а также определяют диапазон, в пределах которого мы способны воспринимать его. Некоторые змеи имеют специализированные рецепторы для восприятия инфракрасного излучения; муравьи и пчелы способны для навигации использовать свойства поляризованного света неба (глава 15). Наши фоторецепторы не способны ни к первому, ни ко второму. Кошки, не имеющие соответствующих рецепторов, не способны воспринимать цвета. Они «страдают» цветовой слепотой, воспринимая все цвета подобно тому, как мы видим в сумерках (когда «все кошки серы»). Чувствительность наших палочек в темноте такова, что один квант света способен вызвать поддающийся измерению сигнал. Однако около 7 палочек должно быть активировано, чтобы мы действительно были способны воспринять свет[3]. При помощи различных подтипов колбочек мы способны вос-

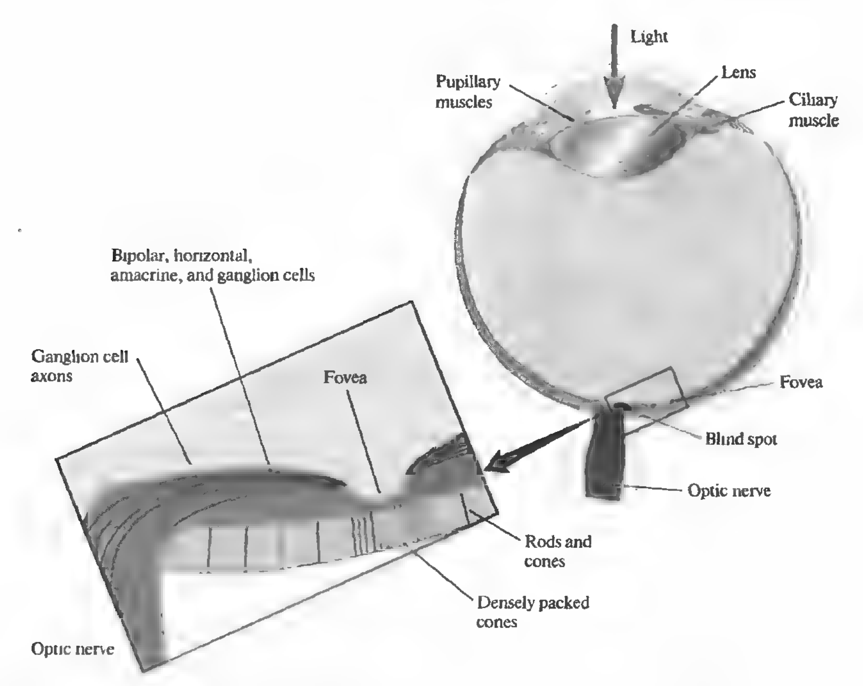


Рис. 19.3. Путь света в полости глаза и клеточное строение сетчатки (поперечный срез глаза). Свет должен пройти через хрусталик и слои клеток сетчатки, чтобы достигнуть фоторецепторов: палочек и колбочек. Центральная ямка (fovea centralis) является специализированной зоной, содержащей только густо расположенные тонкие колбочки, которые способны различать объекты с высоким разрешением. В этом месте слои клеток, расположенные более поверхностно, менее выражены, что позволяет свету непосредственно падать на фоторецепторы. В месте, где зрительный нерв выходит из глаза, отсутствуют фоторецепторы, и потому это место называется «слепым пятном».

Fig. 19.3. Pathways for Light and Arrangement of Cells in the Retina. Cross section through the eye. Light must pass through the lens and layers of cells in order to reach the rod and cone photoreceptors. The fovea is a specialized area, containing only densely packed, slender cones. It is used for fine discrimination. At this point the superficial layers of cells spread apart, permitting more direct access of light to the photoreceptors. The point at which the optic nerve exits the eye has no photoreceptors and thus constitutes a blind spot.

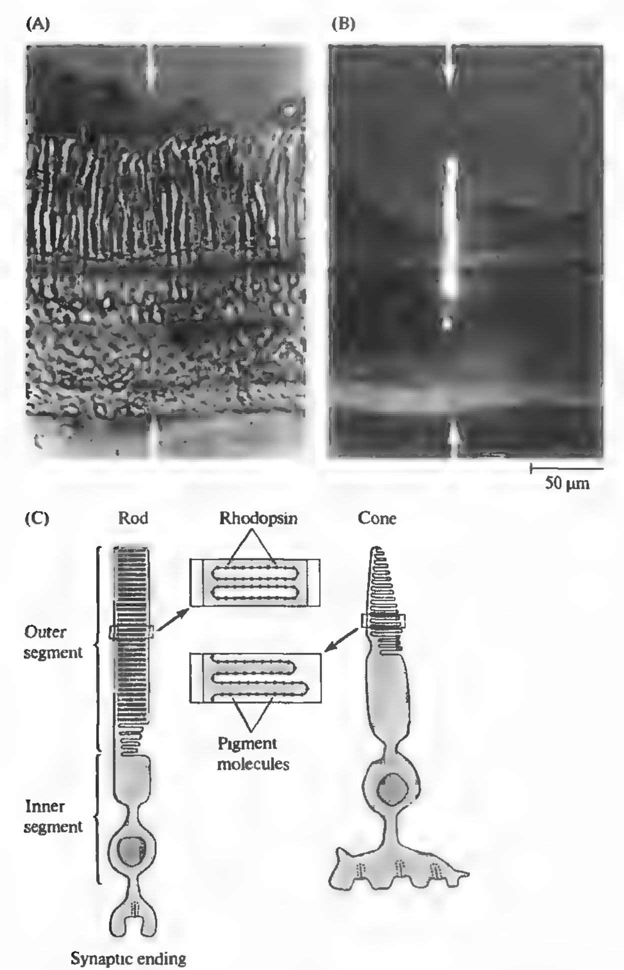


Рис. 19.4. Фоторецепторы сетчатки. (А и В) Палочка сетчатки жабы с введенным в нее флуоресцентным красителем, Lucifer yellow, при обычном (А) и ультрафиолетовом (В) облучении. Стрелками отмечены одинаковые места в сетчатке. (С) Строение палочки и колбочки. В палочке пигмент родопсин (черные точки) встроен в мембраны, расположенные в виде дисков, не связанных с наружной мембраной клетки. В колбочке зрительные пигменты располагаются в складках наружной клеточной мембраны. Наружный сегмент связан с внутренним посредством узкой перемычки. В темноте происходит постоянное высвобождение медиатора нервными окончаниями.

Fig. 19.4. Photoreceptors in Retina. (A and B) Rod in toad retina injected with a fluorescent dye, Lucifer yellow, as seen in visible (A) and ultraviolet (B) light. Arrows mark identical points on the retina. (C) Diagram of a rod and a cone. In the rod, the pigment rhodopsin (black dots) is embedded in membranes arranged in the form of disks, not continuous with the outer membrane of the cell. In the cone, the pigment molecules are on infolded membranes that are continuous with the surface membrane. The outer segment is connected to the inner segment by a narrow stalk. The synaptic endings continually release transmitter in the dark. (A and B kindly provided by the late B. Nunn, unpublished; C after Baylor 1987.)

принимать мельчайшие оттенки и изменения в контрастности и цвете в яркий солнечный день, когда интенсивность света в 100 миллионов раз сильнее, чем ночью.

Организация и морфология фоторецепторов

Палочки и колбочки образуют плотно организованный слой фоторецепторов, расположенный непосредственно над слоем пигментного эпителия (рис. 19.3), на максимальном удалении от роговицы и проникающего в глаз света. За исключением небольшой зоны в области центральной ямки, свет должен пройти через несколько плотных слоев клеток и волокон, чтобы достигнуть наружного сегмента фоторецептора, где и осуществляется поглощение фотонов и фоторецепция. Как Гельмгольц писал в 1867[4]:

На сетчатке имеется удивительное пятно, расположенное вблизи ее центра... которое называется fovea или ямка... Оно является исключительно важным для зрения, ибо именно в области этого пятна возможна наиболее точная дискриминация изображения. Колбочки расположены здесь очень близко друг к другу и получают свет, не искаженный другими полупрозрачными слоями сетчатки. Можно предполагать, что нервное... волокно... начинается непосредственно от каждой колбочки и идет в стволе зрительного нерва в мозг... где вызывает особое ощущение; таким образом, возбуждение каждой индивидуальной колбочки вызывает различные и различимые ощущения.

Просто удивительно, что Гельмгольц написал этот абзац еще до того, как был от-

крыт синапс и вообще появилась клеточная доктрина*).

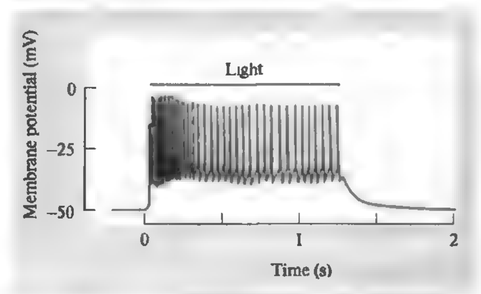
Исследования центральной ямки показали, что в этой зоне колбочки очень плотно упакованы, их плотность составляет 200 000 на мм^2, а палочки отсутствуют. Более того, в области ямки колбочки более узкие, чем в периферических зонах сетчатки[2]. Так как ямка не содержит палочек, ночью она представляет собой «слепое пятно». Существует и отдельное «слепое пятно», которое соответствует зоне на сетчатке, где зрительный нерв покидает глаз; в зоне этого пятна отсутствуют любые фоторецепторы.

На рис. 19.4 показаны три важные особенности строения фоторецепторов: (1) наружный сегмент, где происходит поглощение света зрительными пигментами; (2) внутренний сегмент, где расположены ядро, ионные насосы, трансмембранные переносчики, рибосомы, митохондрии и эндоплазматический ретикулум; и (3) синаптическая терминаль, где происходит высвобождение глутамата на клетки второго порядка, чувствительные к глутаматному сигналу. Зоны секреции в синаптической терминали имеют строго определенное расположение в зависимости от расположения одной или нескольких «ленточных» структур, вдоль которых ориентированы везикулы с медиатором (рис. 19.17)[2].

Электрические сигналы в ответ на свет в фоторецепторах позвоночных

Как указано в главе 17, рецепторы в основном отвечают на соответствующий стимул путем локальной деполяризации переменной амплитуды, которая может вызвать в дальнейшем потенциал действия. И хотя у большинства беспозвоночных фоторецепторы воспринимают свет подобным образом (рис. 19.5А)[5], восприятие света рецепторными клетками у большинства позвоночных происходит по-другому. На рис. 19.5В показаны сигналы, отведенные от палочки черепахи при помощи внутриклеточного электрода[6]. В темноте (во время отдыха) фоторецепторы деполяризуются постоянным входящим током в области наружного сегмента («темновой ток»). Свет приводит к гиперполяризации, уменьшая величину входящего тока. В следующих абзацах будет рассказано, каким образом свет поглощается фоторецепторами и какие механизмы вызывают электрические сигналы, показанные на рис. 19.5.

(A) Invertebrate photoreceptor



(B) Vertebrate photoreceptor

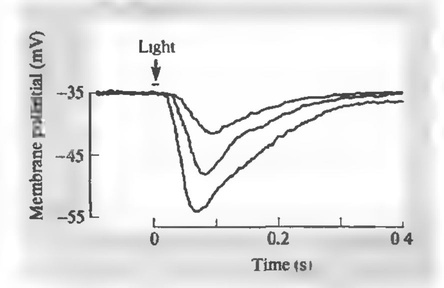


Рис. 19.5. Сигналы от фоторецепторов. (А) Фоторецепторы беспозвоночных (мечехвост) отвечают на свет деполяризацией, вызывающей серию разрядов. Такие ответы являются типичными для сенсорных клеток, чувствительных к различным стимулам: прикосновению, давлению или растяжению (глава 17). (В) Фоторецепторы позвоночных (черепахи) отвечают на свет гиперполяризацией, уровень которой зависит от интенсивности вспышки.

Fig. 19.5. Responses of Photoreceptors. (A) Photoreceptors of an invertebrate (a horseshoe crab) respond to light with a depolarization that gives rise to impulses. This is the usual type of response elicited from sensory receptors activated by various stimuli, such as touch, pressure, or stretch (Chapter 17). (B) Photoreceptors of a vertebrate (a turtle) respond with a hyperpolarization that is graded according to the intensity of the flash. (A after Fuortes and Poggio, 1963; B after Baylor, Fuortes, and O'Bryan, 1971.)

*) Хотя сама по себе «клеточная доктрина», или «клеточная теория», была опубликована Маттиасом Шлейденом и Теодором Шванном в 1839 году («Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений»), она содержала несколько ошибочных утверждений (например, о новообразовании клеток организма из первичного неклеточного вещества), и получила известность и распространение значительно позже, после уточнения ее Рудольфом Вирховым в 1859 году («всякая клетка происходит из другой клетки...»). — *Прим. перев.*

§ 3. Зрительные пигменты

Зрительные пигменты сконцентрированы в мембранах наружных сегментов. Каждая палочка содержит около 10^8 молекул пигмента. Они организованы в несколько сотен дискретных дисков (около 750 в палочке обезьян), которые не связаны с наружной мембраной (см. рис. 19.4С). В колбочках пигмент расположен в особых пигментных складках, которые являются продолжением наружной клеточной мембраны фоторецептора. Молекулы пигмента составляют около 80 % всех белков диска. Зрительные пигменты настолько плотно упакованы в мембранах наружного сегмента, что расстояние между двумя молекулами зрительного пигмента в палочке не превышает 10 нм[7]. Такая плотная упаковка повышает вероятность того, что фотон света при прохождении слоя фоторецепторных клеток будет уловлен. Возникает следующий вопрос: каким образом возникают сигналы при поглощении света зрительными пигментами?



Рис. 19.6. Структура родопсина позвоночных, встроенного в мембрану фоторецептора. Спираль несколько развернута, чтобы показать расположение ретиналя (указано черным). С — С-конец, N — N-конец.

Fig. 19.6. Structure of Vertebrate Rhodopsin in the Membrane. The helix is partly opened to show the position of retinal (black). C = carboxy terminus; N = amino terminus. (After Stryer and Bourne, 1986.)

Поглощение света зрительными пигментами

События, происходящие при поглощении света пигментом палочек — родопсином, изучались при помощи психофизиологических, биохимических и молекулярных методик. Молекула зрительного пигмента состоит из двух компонентов: белковой, называемой опсином, и хромофора, 11-*цис*-витамин А-альдегида, называемого ретиналем (рис. 19.6). Следует уточнить, что хромофор содержит химическую группу, придающую цвет соединению. Количественные характеристики поглощающей способности пигментов были изучены при помощи спектрофотометрии[8, 9]. При освещении родопсина — зрительного пигмента палочек — светом разной длины волны, сине-зеленый свет с длиной волны около 500 нм поглощался лучше всего. Подобный результат был получен и при освещении отдельной палочки под микроскопом пучками света с разной длиной волн. Была выявлена интересная зависимость между спектром поглощения родопсина и нашим восприятием сумеречного света. Количественные психофизические исследования, выполненные на человеке, показали, что голубовато-зеленый дневной свет с длиной волны около 500 нм оптимален для восприятия сумеречного света в темноте. Днем, когда палочки неактивны и используются только колбочки, мы наиболее чувствительны к красному цвету, соответствующему спектру поглощения колбочек (об этом мы поговорим далее)[7].

При поглощении родопсином одного фотона ретиналь претерпевает фотоизомеризацию и переходит из 11-*цис* в *транс*-конфигурацию. Этот переход происходит очень быстро: примерно за 10^{-12} секунд. После этого белковая часть пигмента также претерпевает серию трансформационных изменений, с образованием ряда промежуточных продуктов[10]. Одна из конформаций протеиновой части — метародопсин II — наиболее важна для передачи сигнала (мы обсудим это далее в этой главе). На рис. 19.7 показана последовательность событий при обесцвечивании и регенерации активного родопсина. Метародопсин II образуется уже через 1 мс. Регенерация пигмента после его распада происходит медленно, в течение нескольких минут; для этого необходимо транспортирование ретиналя из фоторецепторов в пигментный эпителий (см. рис. 19.2)[11].

Строение родопсина

На молекулярном уровне белок опсин состоит из 348 аминокислотных остатков, образующий 7 гидрофобных зон, каждая из которых состоит из 20–25 аминокислот, составляя 7 трансмембранных спиралей[12]. N-конец мо-

Рис. 19.7. Выцветание родопсина на свету. В темноте 11-*цис*-ретиналь прочно связан с белком опсином. Захват фотона приводит к изомеризации all-*цис*-ретиналя в *транс*-ретиналь. При этом комплекс опсин-all-*транс*-ретиналь быстро превращается в метародопсин II, который диссоциирует на опсин и all-*транс*-ретиналь. Регенерация родопсина зависит от взаимодействия фоторецепторов и клеток пигментного эпителия. Метародопсин II включает и поддерживает в активном состоянии систему вторичных посредников.

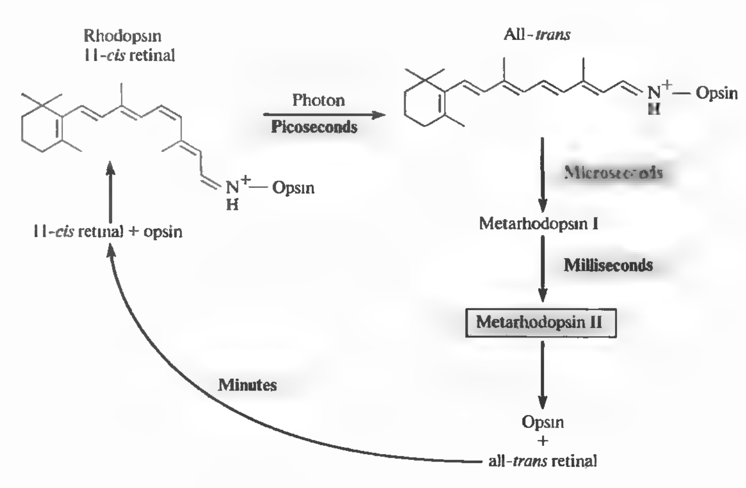


Fig. 19.7. Bleaching of Rhodopsin by Light. In the dark, 11-*cis* retinal is bound to the protein opsin. Capture of a photon causes isomerization of the 11-*cis* retinal to all-*trans* retinal. The opsin–all-*trans* molecule in turn is rapidly converted to metarhodopsin II, which is dissociated to opsin and all-*trans* retinal. The regeneration of rhodopsin depends on interactions between photoreceptors and cells of the retinal pigment epithelium. Metarhodopsin II is the trigger that sets in motion activation of the second messenger system. (After Dowling, 1987.)

лекулы расположен во внеклеточном пространстве (т. е. внутри диска палочки), а С-конец находится в цитоплазме. Ретиналь соединен с опсином через остаток лизина, расположенный в седьмом трансмембранном сегменте. Опсин принадлежит к семейству белков, имеющих 7 трансмембранных доменов, в которое входят и метаботропные рецепторы медиаторов, такие как адренергические и мускариновые рецепторы (см. рис. 19.9). Как и родопсин, эти рецепторы передают сигнал ко вторичным посредникам посредством активации G-белка (главы 2 и 10). Родопсин удивительно стоек в темноте. Байор подсчитал, что для спонтанной тепловой изомеризации молекулы родопсина необходимо около 3000 лет, или в 10^{23} больше, чем для фотоизомеризации[13].

Колбочки и цветовое зрение

Удивительные исследования и эксперименты, выполненные Янгом и Гельмгольцем в XIX веке, привлекли внимание к очень важному вопросу о цветном зрении, и сами же ученые дали четкое и точное объяснение этому феномену. Их вывод о существовании трех различных типов цветовых фоторецепторов выдержал испытание временем и был в последующем подтвержден на молекулярном уровне. Вновь можно процитировать Гельмгольца, который сравнил восприятие света и звука, цвета и звукового тона. Можно позавидовать ясности, силе и красоте его мысли, особенно в сравнении со сбивающими с толку виталистистическими*) концепциями, широко распространенными в XIX веке:

> *Все различия в цветовых тонах зависят от комбинации в различных пропорциях трех основных цветов... красного, зеленого и фиолетового... Подобно тому, как восприятие нами солнечного света и его теплоты зависит... от того, попадают ли лучи солнца на нервы, идущие от рецепторов зрения или от рецепторов тепловой чувствительности. Как предположил Янг в своей гипотезе, различие в восприятии различных цветов зависит просто от того, какой из 3 типов фоторецепторов больше активируется этим светом. Когда все три типа в равной степени возбуждены, получается белый цвет... Если мы проецируем на белый экран два пучка света различных цветов одновременно... мы видим только один цвет, более или менее отличный от обоих этих цветов. Мы сможем лучше понять выдающийся факт того, что мы спо-*

*) Виталистические концепции — так называемые концепции «силы жизни», «природной силы» (vis vitalis), согласно которым каждое живое и органическое вещество наделено особой природной силой, придающей ему свойства живого и определяющей его строение и функционирование. — *Прим. перев.*

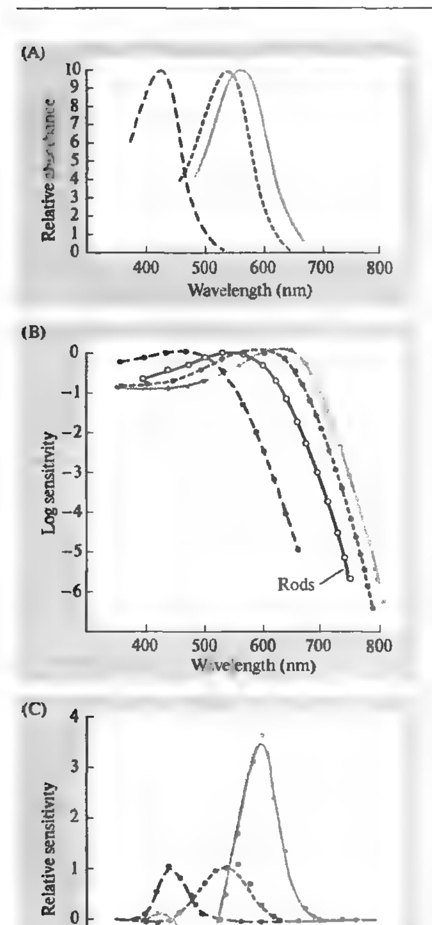
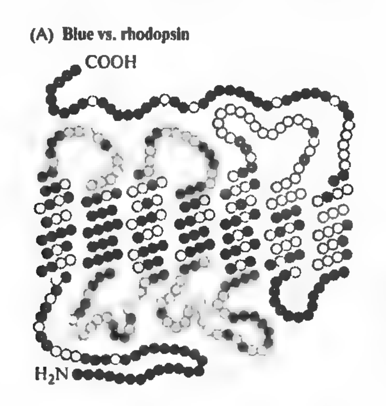


Рис. 19.8. Спектры чувствительности фоторецепторов человека и различных зрительных пигментов. (А) Кривые спектров чувствительности трех цветовых зрительных пигментов, показывающие пики поглощения на длинах волн, соответствующих голубому, зеленому и красному. (В) Спектры чувствительности колбочек к голубому, зеленому и красному цветам, и палочек (показано черным) у макак. Ответы регистрировались при помощи всасывающих электродов, усреднялись и нормализовывались. Кривые спектра палочки были получены при исследовании зрительных пигментов на людях. (С) Сравнение спектров колбочек обезьян и человека при помощи теста чувствительности к цвету. Непрерывная кривая показывает эксперимент по определению чувствительности к цвету у человека, при предъявлении ему света разной длины волны. Пунктиром показаны результаты, предсказанные на основе регистрации токов в отдельных колбочках, после коррекции поглощения света в хрусталике и пигментами на пути к наружному сегменту. Совпадение между результатами обоих опытов удивительно высокое.

Fig. 19.8. Spectral Sensitivity of Photoreceptors of human subjects and of visual pigments. (A) Spectral sensitivity curves of the three colored visual pigments showing absorbance peaks at wavelengths corresponding to blue, green, and red. (B) Spectral sensitivities of blue-, green-, and red-sensitive cones (dashed black, dashed grey and grey lines respectively) and rods (black) from macaque monkeys. The responses were recorded by suction electrodes, averaged and normalized. The curve through the rod spectrum was obtained from visual pigments in human subjects. (C) Comparison of spectral sensitivity of monkey cones with those obtained by human color matching. The continuous curves represent color-matching experiments in which the sensitivity at various wavelengths was determined in human subjects. The dots show results predicted from electrical measurements made by recording currents from single cones, after correcting for absorption in the lens and by pigments on the path to the outer segment. The correspondence between results obtained on single cells and by color matching is extraordinarily good. (A after Schnapf and Baylor, 1987; B after Baylor, 1987; C after Dowling, 1987.)

собны воспринимать все оттенки в составе внешнего света путем смеси трех основных цветов, если мы сравним глаз с ухом... В случае звука... мы слышим более длинные волны как низкие тона, а короткие волны — как высокие и пронзительные, кроме этого ухо способно улавливать одновременно много звуковых волн, т. е. много нот. Однако они в данном случае не сливаются в один сложный аккорд, подобно тому, как различные цвета... сливаются в один сложный цвет. Глаз не может показать разницу, если мы заменяем оранжевый цвет на красный или желтый; но если мы слышим ноты до и ми, звучащие одновременно, нам подобное звучание не кажется нотой ре... Если бы ухо воспринимало музыкальные тона подобно тому, как глаз воспринимает цвета, каждый аккорд мог бы быть представлен комбинацией трех постоянных нот, одной очень низкой, одной очень высокой и одной промежуточной, вызывая все возможные музыкальные эффекты только путем изменений относительной громкости этих трех нот... Однако мы способны видеть плавный переход цветов одного в другой через бесконечное множество оттенков и градаций... То, каким образом мы воспринимаем каждый из цветов... зависит в основном от строения нашей нервной системы. Надо признаться, в настоящее время ни у человека, ни у четвероногих не описана анатомическая база для подтверждения теории восприятия цвета.



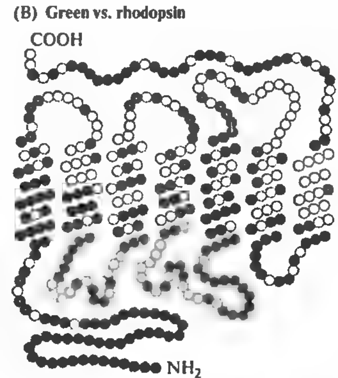
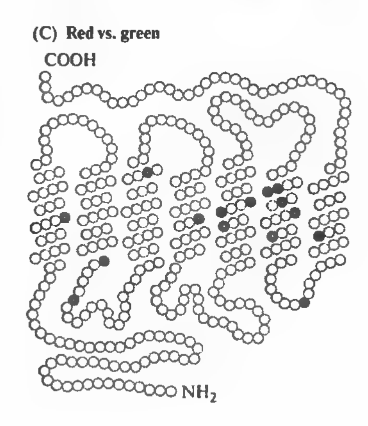


Рис. 19.9. Сравнение аминокислотных последовательностей красного, зеленого и синего пигмента друг с другом и с родопсином. Каждая черная точка показывает различие в аминокислоте. (А и В) Голубой и зеленый пигмент сравниваются с родопсином. (С) Зеленый и красный пигмент сравниваются друг с другом. Первичные последовательности красного и зеленого пигментов удивительно сходны.

Fig. 19.9. Comparisons of Amino Acid Sequences of red, green, and blue pigments with each other and with rhodopsin. Each black dot represents an amino acid difference. (A and B) Blue and green pigments compared with rhodopsin. (C) Green and red pigments compared. The sequences of red and green pigments are highly similar. (From Nathans, 1989.)



Эти точные и дальновидные предсказания были подтверждены серией различных наблюдений. При помощи спектрофотометрии Вальд, Браун, МакНикол и Дартнэл с коллегами[8, 9, 14] показали наличие в сетчатке человека трех типов колбочек с различными пигментами (рис. 19.8А). Также Бейлор с коллегами сумели отвести токи от колбочек обезьян и человека, показанные на рис. 19.8В[15]. Было обнаружено, что три популяции колбочек имеют различные, но перекрывающиеся диапазоны чувствительности к голубой, зеленой и красной части спектра. Оптимальные длины волн для возбуждения электрических сигналов в точности совпали с пиками поглощения света зрительными пигментами, установленными при помощи спектрофотометрии и при психофизических экспериментах по измерению чувствительности глаза к цветовому спектру (рис. 19.8С). В конечном итоге Натансом[16)–18)] были клонированы и секвенированы гены, кодирующие пигмент опсин в трех типах колбочек, чувствительных к красному, зеленому и голубому спектру.

Каким же образом молекулы различных зрительных пигментов способны предпочтительно улавливать свет определенной длины волны? Оказывается, родопсин — зрительный пигмент палочек и все три зрительных пигмента колбочек содержат в своем составе один и тот же хромофор, 11-*цис*-ретиналь. Однако аминокислотные последовательности белковой части пигмента отличаются друг от друга (рис. 19.9). Различиями всего в нескольких аминокислотах и объясняется различная их чувствительность к спектру.

Цветовая слепота

Хотя один тип фоторецептора не способен сам по себе воспринимать цвет, три типа колбочек, как показано на рис. 19.9, уже способны. В принципе, двух типов колбочек с различными пигментами было бы достаточно для распознавания цвета, однако в этом случае ряд комбинаций длин волн воспри-

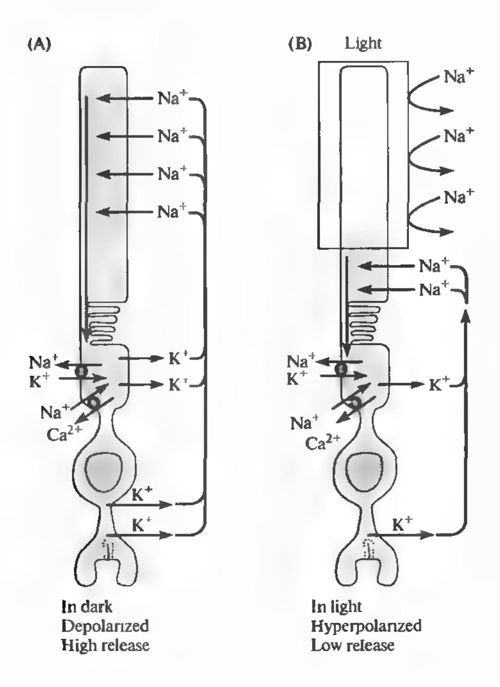


Рис. 19.10. «Темновой» ток в палочке. (А) В темноте ионы натрия проходят через катионные каналы в наружном сегменте палочек, вызывая деполяризацию; ионы кальция также способны проходить через эти катионные каналы. Петля тока проходит через перешеек палочки за счет того, что калиевый ток течет в направлении наружу во внутреннем сегменте мембраны. (В) Когда происходит освещение наружного сегмента, каналы закрываются из-за уменьшения внутриклеточной концентрации цГМФ, и палочка гиперполяризуется. Гиперполяризация проводит к уменьшению высвобождения медиатора. Концентрации натрия, калия и кальция поддерживаются внутри палочки специальными насосами и ионообменниками, расположенными в области внутреннего сегмента (черные кружки). Транпортеры кальция также находятся и в наружном сегменте.

Fig. 19.10. Dark Current in a Rod. (A) In darkness, sodium ions flow through cation channels of the rod outer segment, causing a depolarization; calcium ions also enter through the cation channels. The current loop is completed through the neck of the rod with the outward movement of potassium through the inner segment membrane. (B) When the outer segment is illuminated, the channels close because of a decrease in intracellular cyclic GMP, and the rod then becomes hyperpolarized. This hyperpolarization reduces transmitter release. Sodium, potassium, and calcium concentrations of the rod are maintained by pumps and exchangers in the inner segment (black circles); calcium exchangers are also present in the outer segment. (After Baylor, 1987.)

нимался бы одинаково. Подобная ситуация возникает в случае, когда человек страдает цветовой слепотой. У таких людей, как было показано Натансом, имеются генетические дефекты, приводящие к отсутствию одного из пигментов. С высоты нынешнего состояния науки мы не можем не поразиться тому, как красиво молекулярные механизмы подтверждают блистательные и на удивление точные размышления Янга и Гельмгольца. Их идея о том, что основные атрибуты цветного зрения и цветовой слепоты должны быть обнаружены в самих фоторецепторах, были подтверждены при помощи прямых физиологических измерений, а также при изучении различий в строение пигментов на генетическом и белковом уровнях.

§ 4. Передача сигнала в фоторецепторах

Каким образом фотоизомеризация родопсина приводит к изменению мембранного потенциала? На протяжении многих лет было понятно, что необходим какой-то внутренний посредник для возбуждения электрических сигналов в палочках и колбочках. Одной из причин подозревать, что информация о поглощении фотонов в области наружного сегмента палочки передается при помощи переносчика, был тот факт, что сам пигмент родопсин находится внутри диска, а сигнал распространяется через цитоплазму до внешней мембраны. Второй причиной было значительное усиление ответа. Бейлор с коллегами[19], изучая фоторецепторы черепахи, показал, что уменьшение мембранной проводимости и регистрируемых электрических сигналов возникает уже при поглощении всего одного фотона и активации одной из 10^8 пигментных молекул.

Последовательность событий, при которых активировавшаяся молекула фотопигмента изменяет мембранный потенциал, была выяснена при изучении наружных сегментов палочек и колбочек, используя методы двухэлектродной фиксации потенциала и методов молекулярной биологии. Схема передачи сигнала от поглощения фотона света до электрического сигнала показана на рис. 19.10.

В темноте в наружных сегментах палочек и колбочек протекает постоянный входящий «темновой» ток[20]. В результате их мембран-

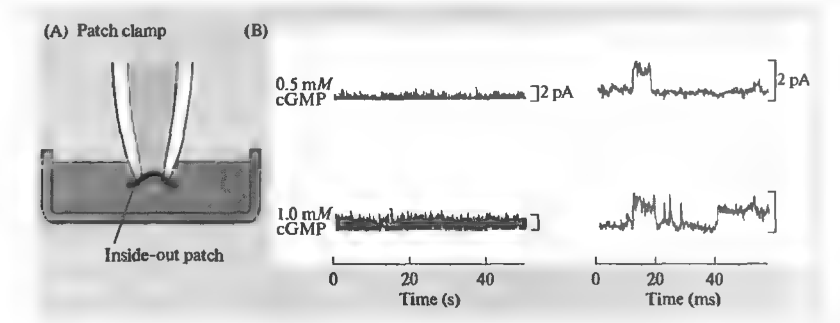


Рис. 19.11. Роль цГМФ в открытии натриевых каналов наружного сегмента палочек. Проводилась регистрация активности одиночных каналов при помощи inside-out patch clamp, находящихся в растворе с разной концентрацией цГМФ. Открытие канала приводит к отклонению тока вверх. Частота открытия каналов была очень низка в контроле, добавление цГМФ приводило к увеличению частоты открытия одиночных каналов, которая прямо зависела от концентрации цГМФ.

Fig. 19.11. Role of Cyclic GMP in Opening Sodium Channels in rod outer segment membranes. Single-channel recordings made from inside-out patches bathed in various concentrations of cyclic GMP. Channel opening causes deflections in the upward direction. The frequency of channel opening is extremely low in control recordings. Addition of cyclic GMP causes single-channel openings, the frequency of which increases with increased concentration. (After Baylor, 1987.)

ный потенциал составляет порядка −40 мВ, что далеко от равновесного калиевого потенциала E_K, составляющего −80 мВ. Входящий ток в темноте переносится в основном ионами натрия, следующими по электрохимическому градиенту через катионные каналы наружного сегмента. Гиперполяризация фоторецептора при действии света обусловлена закрытием этих каналов, что приводит к сдвигу мембранного потенциала в сторону E_K.

Свойства каналов фоторецептора

Катионные каналы наружного сегмента при физиологических условиях имеют соотношение в проводимости ионов кальция/натрия/калия как 12,5 : 1,0 : 0,7 и проводимость одиночного канала около 0,1 пСм[21]. Из-за того, что концентрация натрия гораздо выше, чем концентрация кальция, около 85 % входящего тока приходится на ионы натрия. Движущая сила ионов калия направлена наружу клетки. При прохождении канала ионами кальция, эти ионы прочно связываются со стенкой поры и мешают, таким образом, проведению других ионов. Именно из-за этого удаление кальция из внеклеточной среды приводит к более легкому прохождению ионов калия и натрия через каналы, проводимость которых возрастает до 25 пСм.

Фесенко, Яу, Бейлор, Страйер с коллегами[22)–24)] показали, что циклическая ГМФ играет роль внутреннего переносчика сигнала от диска к поверхности мембраны. Как показано на рис. 19.11, высокая концентрация цГМФ в цитоплазме поддерживает катионные каналы в открытом состоянии. При уменьшении концентрации цГМФ с внутренней поверхности мембраны открытие катионных каналов становится редким событием. Таким образом, мембранный потенциал фоторецепторов является отражением концентрации цГМФ в цитоплазме: чем выше концентрация цГМФ, тем больше деполяризация клетки. Концентрация же цГМФ, в свою очередь, зависит от интенсивности падающего света. Повышение интенсивности света приводит к уменьшению концентрации цГМФ и уменьшает долю открытых каналов. В отсутствии цГМФ почти все каналы закрыты, и сопротивление мембраны наружного сегмента приближается к значению сопротивления липидного бислоя.

Молекулярная структура цГМФ-управляемых каналов

Была выделена кДНК для ионных каналов наружного сегмента палочек и определены аминокислотные последовательности субъединиц данных каналов в сетчатке человека, быка, мыши и курицы. Было обнаружено значительное сходство ДНК для этих и других цГМФ-управляемых ионных каналов — например, найденных в обонятельной

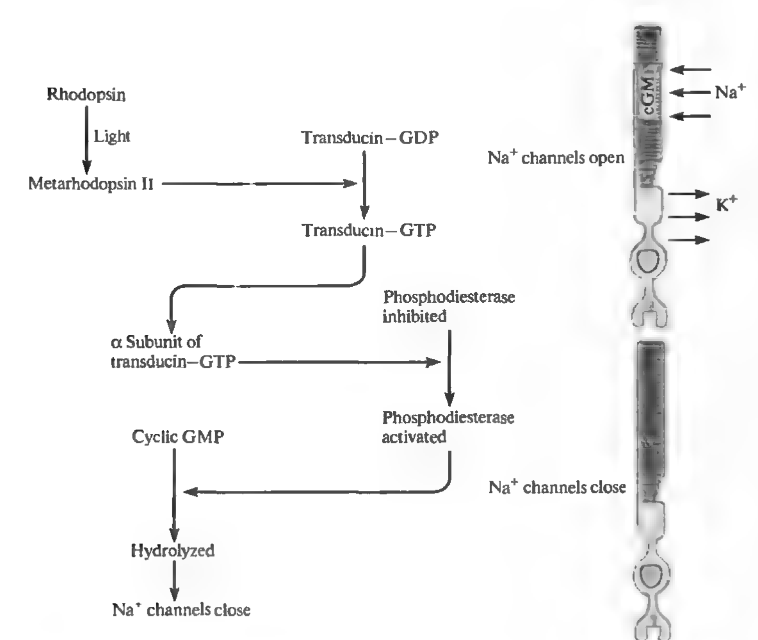


Рис. 19.12. Механизм активации G-белка при активации молекулы фотопигмента. G-белок трансдуцин связывает ГТФ в присутствии метародопсина II, что приводит к активации фосфодиэстеразы, которая, в свою очередь, гидролизует цГМФ. При падении концентрации цГМФ закрываются натриевые каналы.

Fig. 19.12. Coupling of Photopigment Activation to G Protein Activation. The G protein transducin binds GTP in the presence of metarhodopsin II, leading to activation of phosphodiesterase, which in turn hydrolyzes cyclic GMP. With the reduced concentration of cyclic GMP, sodium channels close. (After Baylor, 1987.)

системе[25, 26]. Мембранные участки этих каналов проявляют структурные сходства с другими катион-селективными каналами, особенно в области S4 и в области, формирующей ионную пору (глава 3). Ионные каналы фоторецептора являются тетрамерами, составленными, по крайней мере, из 2 различных белковых субъединиц α и β с молекулярной массой 63 и 240 кДа соответственно. Внутриклеточные места связывания нуклеотидов расположены около карбоксильного конца α и β-субъединиц[27]. Экспрессия этих субъединиц в ооцитах приводит к формированию катионных каналов, имеющих свойства подобные каналам, расположенным в наружных сегментах палочек: они активируются цГМФ и имеют ожидаемые соотношения проводимости и проницаемости[28].

Метаболический каскад циклического ГМФ

Цепочка событий, приводящих к уменьшению концентрации цГМФ и к последующему закрытию ионных каналов, показана на рис. 19.12. Уменьшение внутриклеточной концентрации цГМФ вызывается светом, приводящим к образованию метародопсина II, промежуточного продукта в распаде фотопигмента (см. рис. 19.7). Метародопсин II воздействует, в свою очередь, на G-белок **трансдуцин**, который состоит из 3 полипептидных цепей — α, β и γ[29, 30].

Взаимодействие метародопсина II и трансдуцина приводит к замене связанной с G-белком молекулы ГДФ на ГТФ (глава 10). Это активирует α-субъединицу G-белка, которая отделяется от β- и γ-субъединиц и, в свою очередь, активирует расположенную в примембранной области фосфодиэстеразу: фермент, который гидролизует цГМФ. Концентрация цГМФ падает, становится меньше открытых ионных каналов, палочка гиперполяризуется. Каскад прерывается при фосфорилировании С-конца активного метародопсина II. Ключевая роль цГМФ в регулировании состоянии катионных каналов была подтверждена биохимическими экспериментами. Освещение фоторецепторов может вызвать 20 % падение уровня цГМФ в клетке[13].

Рецепторы позвоночных, деполяризующиеся при действии света

Интересным исключением из механизма фоторецепции, приведенного выше, являются некоторые рецепторы позвоночных. У ящериц есть третий глаз, расположенный на макушке. В нем находятся маленькие «кол-

бочки», способные воспринимать изображение, сходное с воспринимаемым основными (боковыми) глазами. Эти фоторецепторы, однако, примечательны тем, что деполяризуются при освещении[31, 32]. Каналы, управляемые нуклеотидами, здесь имеют сходное строение и функционирование с фоторецепторами других позвоночных, за одним исключением: активация фоторецептора и G-белка приводит к увеличению концентрации цГМФ. В результате этого каналы наружного сегмента открываются, и катионы направляются внутрь клетки, формируя «световой» ток. Это происходит благодаря угнетению активности фосфодиэстеразы в темноте. В результате в глазу ящерицы происходит следующая последовательность событий:

свет → [цГМФ]↑→ открытие катионных каналов наружного сегмента → → деполяризация.

Усиление сигнала в каскаде цГМФ

Двухэтапный каскад цГМФ обеспечивает значительное усиление исходного сигнала, чем и объясняется исключительная чувствительность палочек к свету. Во-первых, одна молекула активного метародопсина II катализирует присоединение многих молекул ГТФ вместо ГДФ и, таким образом, освобождает сотни α-субъединиц G-белка[33]. Во-вторых, каждая α-субъединица активирует одну молекулу фосфодиэстеразы в диске, которая способна расщепить огромное количество молекул цГМФ, находящихся в цитоплазме, и таким образом привести к закрытию большого количества каналов.

Сигналы в ответ на одиночные кванты света

Данные о том, что одиночные кванты света могут вызывать воспринимаемое ощущение света, вызвали большое количество вопросов. Насколько велик этот единичный ответ? Каким образом этот сигнал выделяется

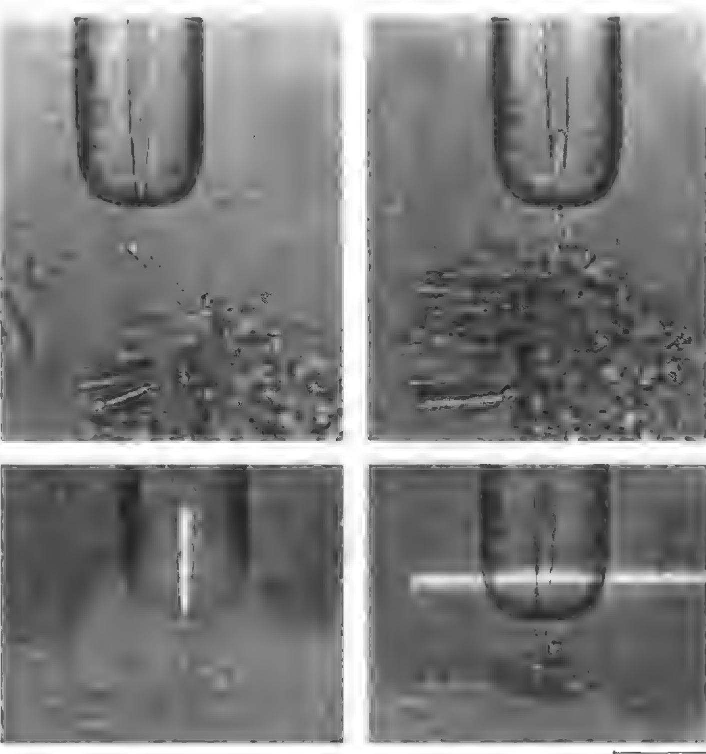
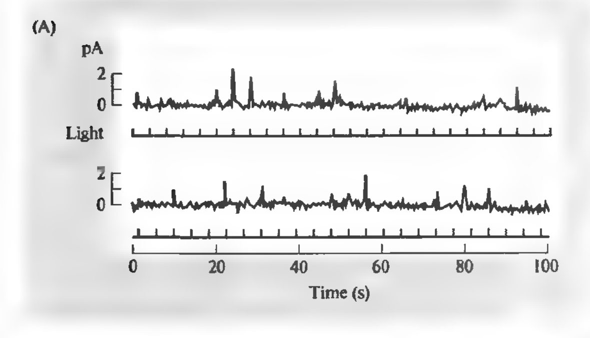
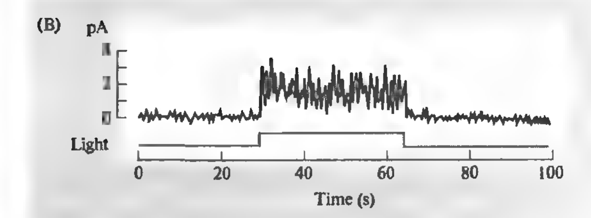


Рис. 19.13. Метод регистрации мембранных токов в наружном сегменте палочек. Специальный электрод с тонким кончиком подсасывается к наружному сегменту палочки, выступающему из кусочка сетчатки жабы. Узконаправленный пучок света освещает строго одну фоторецепторную клетку. Так как электрод плотно охватывает клетку, можно зарегистрировать любой ток, текущий в клетку или из клетки.

Fig. 19.13. Method for Recording Membrane Currents of a Rod Outer Segment. A suction electrode with a fine tip is used to suck up the outer segment of a rod that protrudes from a piece of toad retina. Slits of light illuminate the receptor with precision. Since the electrode fits tightly around the photoreceptor, current flowing into it or out of it is recorded. (From Baylor, Lamb, and Yau, 1979.)





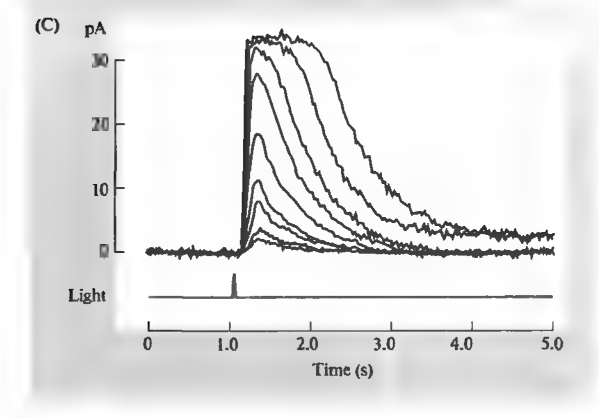


Рис. 19.14. Сигналы, записанные при помощи всасывающего электрода в области наружного сегмента палочки обезьяны. (А) Ответы на слабые вспышки света (показанные нижней линией с подписью "Light"), показано две записи. Наблюдается флуктуация тока квантового характера. Миниатюрные пики соответствуют активации зрительных пигментов отдельными фотонами. Довольно часто фотоизомеризация не возникает. (В) Постоянное, более сильное освещение (нижний график) приводит к серии сигналов. (С) Сигналы, записанные от палочки сетчатки обезьяны, вызваны вспышками растущей интенсивности. Эти сигналы те же, что указаны и на рис. 19.5В.

Fig. 19.14. Recordings Made by Suction Electrode from Monkey Rod Outer Segment. (A) Responses to dim flashes (applied as indicated in the traces labeled "Light") are shown in the two current traces. The currents fluctuate in a quantal manner. Smaller deflections are the currents generated by single photons interacting with visual pigments. Often photoisomerizations failed to occur. (B) Steady, more intense illumination (bottom trace) gives rise to a burst of signals. (C) Records from a rod in a monkey retina with flashes of increasing intensity. These currents are the counterpart of voltage traces shown in Figure 19.5B. (From Baylor, Nunn, and Schnapf, 1984.)

из уровня шума? И каким образом такая информация достоверно передается из сетчатки в высшие зрительные центры? Чтобы измерить сигналы в ответ на одиночные кванты света, Бейлор с коллегами регистрировали токи от отдельных палочек в сетчатках жабы, обезьяны и человека (рис. 19.13)[39]. Эти опыты представляют собой уникальный пример эксперимента, в котором показано, как такой сложный процесс, как восприятие слабых вспышек света, может коррелировать с изменениями, происходящими на уровне отдельных молекул[40].

Процедура по изоляции фрагмента сетчатки от животного либо трупного материала должна для этих экспериментов производиться в темноте. Для измерения тока наружный сегмент палочки засасывается в тонкую пипетку (см. рис. 19.13). Как и ожидалось, эти эксперименты показывают, что в темноте ток постоянно течет внутрь наружного сегмента. Вспышки света приводят к закрытию каналов в наружном сегменте, вызывая уменьшение «темнового» тока. На рис. 19.14А показаны ответы наружного сегмента на очень слабые вспышки света, соответствующие 1–2 кван-

там. Амплитуда токов невелика и пропорциональна числу поглощенных квантов. Иногда вспышка вызывает одиночный ответ, иногда — двойной, а иногда — вообще никакой реакции.

В палочках обезьяны уменьшение тока в ответ на поглощение одного фотона. составляет около 0,5 пА. Это соответствует закрытию порядка 300 каналов, т. е. от 3 до 5 % всех открытых в темноте каналов. Это достигается благодаря значительному усилению сигнала в метаболическом каскаде цГМФ. Более того, из-за крайней стабильности зрительных пигментов, упомянутой ранее, случайная изомеризация и ложное закрытие каналов — события очень редкие. Это приводит к тому, что эффекты отдельных квантов света выделяются на фоне очень низкого постоянного шума. Было показано, что электрическая связь посредством щелевых контактов между фоторецепторами обеспечивает дополнительный сглаживающий эффект, который уменьшает фоновый шум и улучшает отношение сигнал/шум ответов палочек на одиночные кванты[36].

§ 5. Передача сигнала от фоторецепторов на биполярные клетки

Много вопросов связано с передачей сигнала в сетчатке. Каким образом колбочки и палочки влияют на биполярные клетки? Какова роль горизонтальных и амакриновых клеток в процессе передачи сигнала? Анализ передачи сигнала этими нейронами в наружном и внутреннем плексиформных слоях (рис. 19.15) требует сочетания различных методов исследования, в том числе микроэлектродной регистрации токов, использования специфических красителей, морфологических исследований, клеточной нейрогистохимии, идентификации рецепторов и медиаторов.

Биполярные, горизонтальные и амакриновые клетки

Общая схема связей между клетками сетчатки была составлена на основе морфологических описаний Рамон-и-Кахаля: проводящий путь от фоторецепторов до ганглиозных клеток при

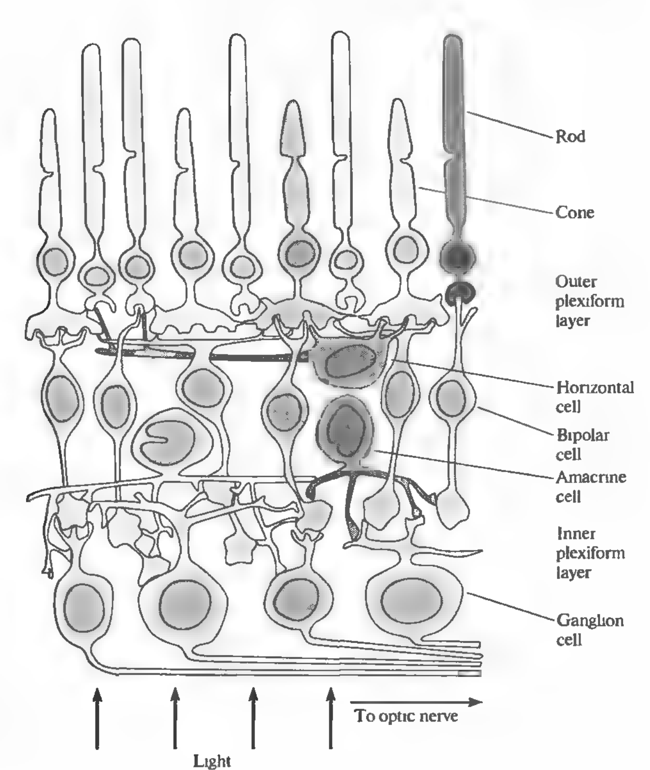


Рис. 19.15. Основные клеточные типы и соединения в сетчатке приматов представлены здесь для иллюстрации связей между фоторецепторами (палочками и колбочками) и ганглиозными клетками.

Fig. 19.15. Principal Cell Types and Connections of Primate Retina to illustrate rod and cone pathways to ganglion cells. (After Dowling and Boycott, 1966; Daw, Jensen, and Brunken, 1990.)

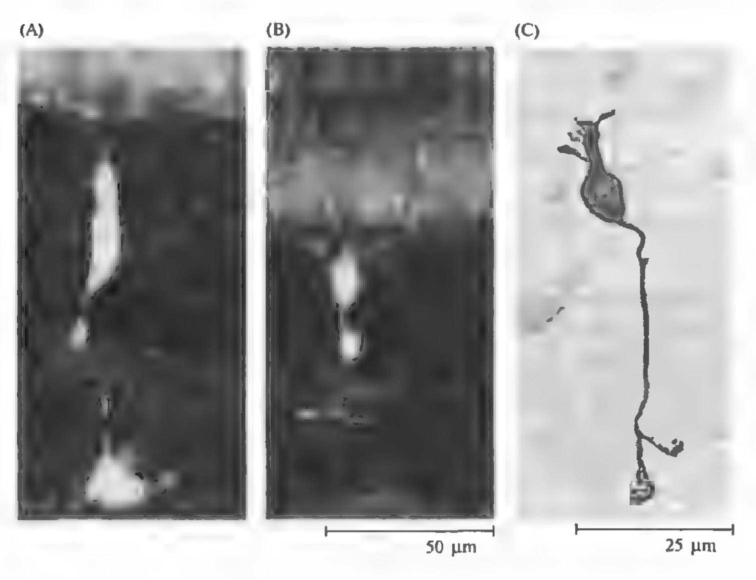


Рис. 19.16. Биполярные, горизонтальные и амакриновые клетки. (A) Деполяризующаяся биполярная клетка "on"-центра золотой рыбки с введенным флуоресцентным красителем. (B) Гиперполяризующаяся биполярная клетка "off"-центра золотой рыбки. (C) Выделенная биполярная клетка из сетчатки крысы, окрашенная на протеинкиназу C. (D) Горизонтальная клетка акулы (морской собаки) с введенной пероксидазой хрена. (E) Накапливающая индоламин амакриновая клетка из сетчатки кролика с введенным красителем Lucifer Yellow.

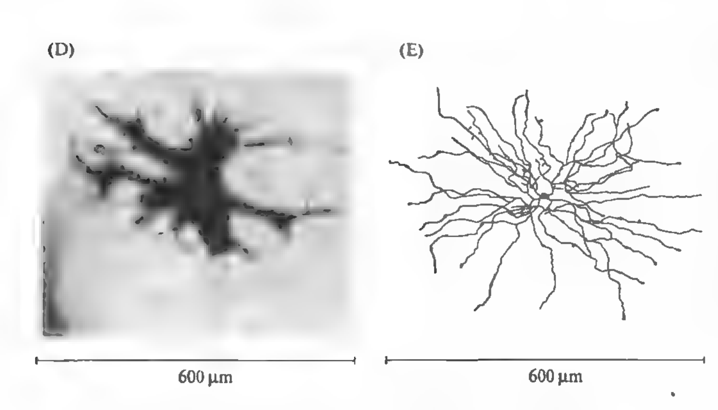


Fig. 19.16. Bipolar, Horizontal, and Amacrine Cells. (A) A depolarizing "on"-center bipolar cell of goldfish injected with fluorescent dye. (B) A hyperpolarizing "off"-center goldfish bipolar cell. (C) A bipolar cell isolated from rat retina stained for protein kinase C. (D) A horizontal cell in dogfish retina injected with horseradish peroxidase. (E) Indolamine-accumulating amacrine cell from rabbit retina injected with Lucifer yellow. (A, B, and D kindly provided by A. Kaneko, unpublished; C from Yamashita and Wässle, 1991; E from Masland, 1988.)

помощи биполярных клеток, с регулированием передачи посредством горизонтальных и амакриновых клеток[42]. Исходя из схемы соединений клеток в сетчатке приматов становится понятным, что конечный выходной сигнал является результатом сложного интегративного процесса, происходящего в самой сетчатке. Например, горизонтальная клетка, показанная на рис. 19.16D, получает синаптические входы от многих фоторецепторов и, в свою очередь, образует с ними модулирующую обратную связь. Горизонтальные клетки также образуют окончания на биполярных клетках. Аналогично некоторые амакриновые клетки (рис. 19.16E), получающие сигналы от биполярных клеток, посылают аксоны как обратно на биполярные, так и на ганглиозные клетки. Можно сделать вывод, что горизонтальные и амакриновые клетки осуществляют и модулируют процесс передачи сигнала в сетчатке. Дополнительную сложность создает то, что каждый из основных классов нейронов, показанных на рис. 19.15 и 19.16, имеет множество морфологических и фармакологических подтипов[2]. При помощи электрофизиологических, биохимических и анатомических критериев было описано несколько основных классов биполярных клеток, больще чем 2 типа горизонтальных клеток и по крайней мере 20 типов амакриновых клеток[43]–[45].

Медиаторы в сетчатке

В сетчатке были обнаружены практически все известные медиаторы[46]–[49]. Глутамат высво-

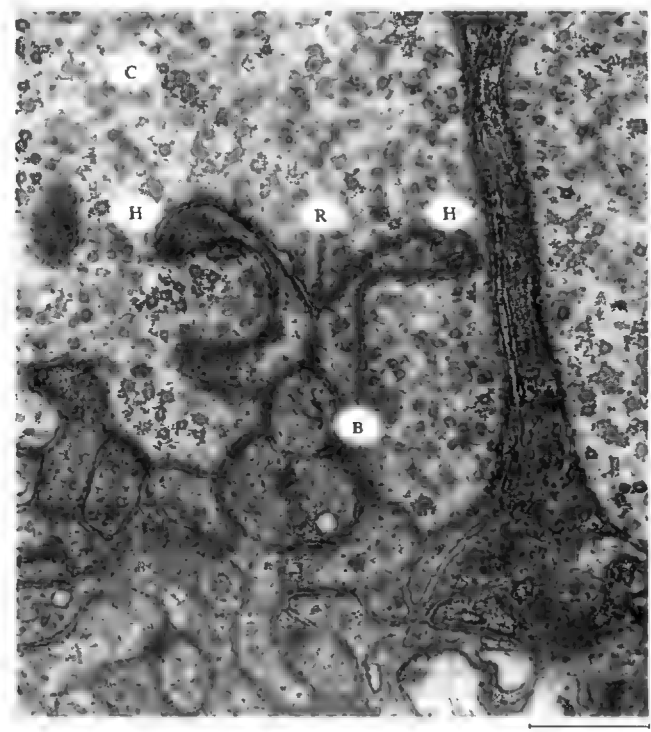


Рис. 19.17. Лентовидные синапсы, образованные терминалью фоторецептора на окончаниях биполярных и горизонтальных клеток. Пресинаптические везикулы в терминалях колбочек (C) выстроены вдоль ленты (R). Данный тип синапсов приспособлен к постоянному высвобождению квантов глутамата к биполярным (B) и горизонтальным (H) клеткам в темноте. Через ГАМКергические горизонтальные клетки осуществляется обратная связь с фоторецепторами.

Fig. 19.17. Ribbon Synapses Made by a Photoreceptor Terminal on bipolar and horizontal cell endings. Presynaptic vesicles in a cone terminal (C) are aligned along the ribbon (R). This type of synapse is adapted for maintained release of quanta of glutamate onto bipolar (B) and horizontal (H) cells in darkness. The horizontal cell, which releases GABA, feeds back onto the receptor terminal. (Micrograph kindly provided by P. Sterling.)

бождается фоторецепторами и биполярными клетками. Горизонтальные клетки секретируют ГАМК. Некоторые амакриновые клетки секретируют дофамин, другие ацетилхолин или индоламины. Распределение и функциональная значимость этих медиаторов, рецепторов и их субъединиц, а также переносчиков сигнала были детально изучены методами иммуногистохимии и гибридизации **in situ**. Некоторые медиаторы-пептиды, например VIP (вазоактивный интестинальный пептид), обнаруженные в глазу[50], могут играть важную трофическую роль в развитии зрительной системы и быть связаны с развитием миопии (близорукости)[51].

Постоянное высвобождение квантов глутамата фоторецепторами в темноте осуществляется при помощи специального типа нервных окончаний, называемых **лентовидными синапсами** (ribbon synapses)[2, 52, 53]. Пример такого синапса показан на рис. 19.17. Терминаль колбочки содержит везикулы, плотно связанные с мембраной и готовые к высвобождению, которые расположены вдоль длинной плоской органеллы, называемой «лентой» (ribbon). Постсинаптическая мембрана образована терминалями биполярных и горизонтальных клеток, которые формируют инвагинации на окончаниях фоторецепторов.

Концепция рецептивных полей

Техника освещения определенных зон сетчатки привела к появлению такой важной концепции, как **рецептивное поле**, которая стала ключом к пониманию значения сигналов не только на уровне сетчатки, но и на последующих стадиях в коре. Сам термин «рецептивное поле» был исходно введен Шеррингтоном по отношению к рефлексам (см. также главу 18) и был перенесен в зрительную систему Хартлайном. Рецептивное поле нейрона зрительной системы может быть определено как *зона сетчатки, при падении света на которую может изменяться активность данного нейрона* (см. также главу 18). Например, регистрация активности одного нейрона зрительного нерва и коры кошки показала, что частота его импульсации увеличивается или уменьшается, если меняется освещение над определенной зоной сетчатки (см. рис. 19.18 и 19.21). Эта зона является рецептивным полем данного нейрона.

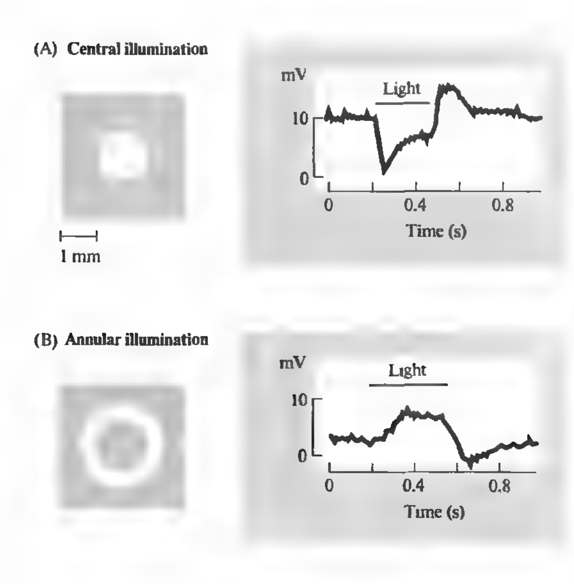


Рис. 19.18. Карта рецептивных полей биполярных клеток, чувствительных к гиперполяризации (Н). Сигналы регистрировались на биполярной клетке сетчатки золотой рыбки, которая отвечала гиперполяризацией (А) на освещение центра рецептивного поля. Освещение в виде кольца вызывало деполяризацию клетки (В). Рассеянный свет слабо влиял на потенциал клетки. Для биполярной клетки, чувствительной к деполяризации (D), освещение центра рецептивного поля приводит к деполяризации, в то время как освещение в виде кольца вызывает гиперполяризацию.

Fig. 19.18. Receptive Field Organization of a Hyperpolarizing (H) Bipolar Cell. Records made from the bipolar cell in the goldfish retina show a hyperpolarization (A) in response to illumination of the center of the receptive field. Annular illumination causes the cell to respond with a depolarization (B). Diffuse light would have little effect on the cell. For a depolarizing (D) bipolar cell, illumination of the center would produce depolarization, while the annulus would produce hyperpolarization. (After Kaneko, 1970.)

По определению освещение за пределами рецептивного поля не оказывает влияния на импульсацию. Эта зона сама по себе может быть подразделена на несколько различных регионов, освещение некоторых из которых увеличивает активность, а других подавляет. Это описание рецептивных полей также применимо по отношению к другим нейронам, таким как биполярные и горизонтальные клетки, у которых локальный ответ переменной амплитуды вызывается падением света на сетчатку (что обсуждается далее в этой главе). Как будет показано далее, отдельные вспышки ненаправленного света практически бесполезны при оценке функции зрительной системы.

Ответы биполярных клеток

Каждая биполярная клетка получает сигналы непосредственно от палочки либо от колбочки. Клетки обычно получают сигналы от 15–45 рецепторов. Существует особый тип биполярных клеток, так называемые «карликовые биполяры» (midget bipolar), которые получают сигнал только от одной колбочки[2]. Логично ожидать, что большинство карликовых биполяров находится в области ямки, где острота зрения максимальна. Они передают сигналы с фоторецептора на специальный тип ганглиозных клеток. В других отделах сетчатки биполярные клетки собирают информацию с 15–20 колбочек. Биполярные и горизонтальные клетки отвечают на освещение градуальной де- или гиперполяризацией.

Сигналы и рецептивные поля биполярных клеток зависят от двух механизмов. Во-первых, постоянное высвобождение медиатора в темноте способствует поддержанию ряда биполярных клеток в состоянии постоянной деполяризации, а других — в состоянии гиперполяризации, в зависимости от того, какие — возбуждающие или тормозные — рецепторы они имеют. Во-вторых, свет приводит к гиперполяризации фоторецепторов, тем самым уменьшая выброс глутамата. Уменьшение постоянного освобождения глутамата фоторецепторами при освещении приводит, соответственно, к уменьшению активности биполярных клеток, имеющих возбуждающие рецепторы глутамата, т. е. вызывают их гиперполяризацию[55]. Такие клетки называются Н-биполяры (hyperpolarizing).

Наоборот, уменьшение тонического высвобождения глутамата фоторецепторами при освещении последних приводит к деполяризации тех биполярных клеток, которые экспрессируют тормозные рецепторы глутамата — это D-биполяры (depolarizing). D-биполярные клетки являются одним из редким типов клеток, у которых были обнаружены тормозные эффекты, опосредуемые через рецепторы глутамата (глава 14). Канеко с коллегами показали, что данный тормозный эффект обусловлен

метаботропными рецепторами глутамата, расположенными на мембранах биполярных клеток, которые действуют через G-белок и вторичные посредники, приводя к уменьшению ионной проводимости[56, 57]. Таким образом, в темноте в результате активации этих рецепторов ионные каналы, управляемые циклическими нуклеотидами на D-биполярных клетках, закрываются (в отличие от каналов фоторецепторов). После освещения высвобождение глутамата уменьшается, открываются катионные каналы, и биполярные клетки деполяризуются[58].

Структура рецептивных полей биполярных клеток

Рецептивное поле гиперполяризующейся Н-биполярной клетки показано на рис. 19.18. Небольшой пучок света, направленный на центральную область поля, вызывает длительную гиперполяризацию. Освещение в форме кольца с темной зоной в центре приводит к деполяризации. Таким образом, рецептивная область подобной клетки состоит из различных по светочувствительности **центральной зоны** и окружающей ее **периферии**. Н-биполярная клетка, показанная на рис. 19.18, может быть описана как клетка, имеющая рецептивное поле с "off"-центром, поскольку она деполяризуется, когда поток света исчезает.

D-биполярная клетка имеет рецептивное поле сходной концентрической формы, но освещение центра ее поля приводит к деполяризации, а освещение в форме кольца — к гиперполяризации. Из-за того, что она деполяризуется, когда включается свет, считается, что D-биполярная клетка имеет рецептивное поле с "on"-центром. Терминология "on"- и "off"-клеточных ответов будет активно использоваться нами далее при описании свойств рецептивных полей на следующих этапах зрительной системы. Важным принципом является то, что отдельные фоторецепторы могут одновременно находиться в центре одних рецептивных полей, контролируемых "on"- либо "off"-биполярной клеткой, в то же самое время являясь периферией в других рецептивных полях.

Горизонтальные клетки и ингибирование периферии

Ответы D- и Н-биполярных клеток при освещении периферии рецептивных зон опосредуются горизонтальными клетками. Каждая горизонтальная клетка получает информацию от большого количества фоторецепторов. Горизонтальные клетки, подобно Н-биполярным клеткам, отвечают на освещение фоторецепторов гиперполяризацией (из-за того, что при освещении уменьшается выделение фоторецепторами глутамата). Другой особенностью горизонтальных клеток является то, что они связаны друг с другом посредством электрических синапсов[59]. Краситель люциферовый желтый (Lucifer yellow), введенный в одну горизонтальную клетку, распространяется через щелевые контакты в другие нейроны. Таким образом, каждая горизонтальная клетка получает влияние с большой зоны сетчатки, иннервируемой ею и ее ближайшими соседями.

Горизонтальные клетки образуют с биполярными и фоторецепторными клетками тормозные синаптические соединения, в которых медиатором служит ГАМК[60)–62]. Таким образом, деполяризации фоторецепторов в темноте противостоит тормозное влияние горизонтальных клеток. Освещение фоторецепторов приводит к гиперполяризации горизонтальных клеток, и, следовательно, к уменьшению выделения ими ГАМК. Получается, что гиперполяризации фоторецепторов рассеянным светом противостоит соответствующее уменьшение секреции ГАМК в синапсах между фоторецептором и горизонтальной клеткой. Было высказано предположение, что определенную роль здесь играет оксид азота, синтезируемый как фоторецепторами, так и горизонтальными клетками, которые также вносят вклад в угнетение высвобождения глутамата фоторецепторами[63]. В итоге отрицательная обратная связь между фоторецепторами и горизонтальными клетками происходит по следующей схеме:

свет
↓
гиперполяризация фоторецепторов
↓
гиперполяризация горизонтальных клеток
↓
деполяризация фоторецепторов.

Соединения клеток в случае центрального "on"- и периферического "off"-ответов биполярных клеток схематично показаны на рис. 19.19. Для простоты центральная зона представлена всего одним фоторецептором, а периферия — несколькими соседними фоторецепторами, связанными с одной горизонтальной клеткой. Сигнал в ответ на осве-

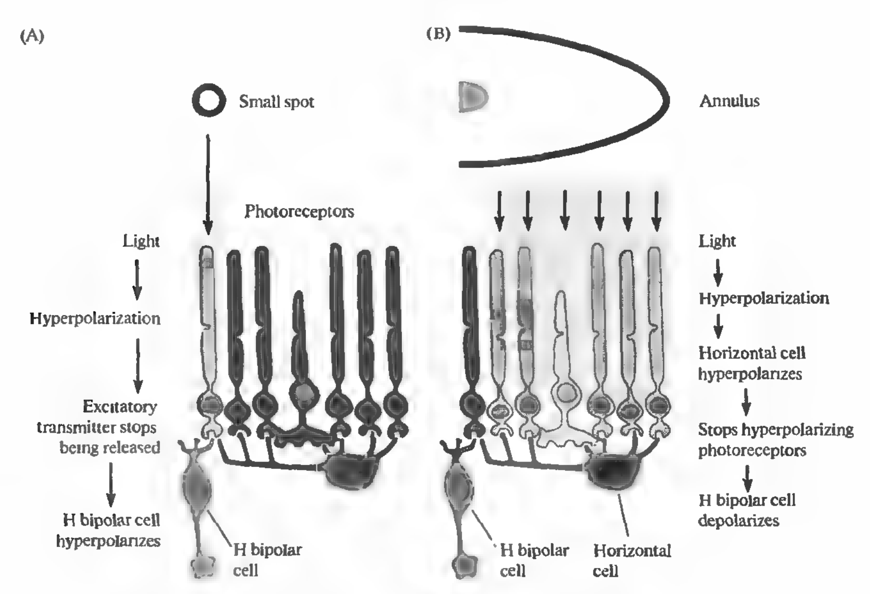


Рис. 19.19. Соединения между фоторецепторами, биполярными и горизонтальными клетками. (А) Свет, падая на отдельную фоторецепторную клетку, вызывает ее гиперполяризацию, результатом чего является прекращение выделения глутамата. В результате Н-биполярная клетка, как показано на рис. 19.18, гиперполяризуется, уменьшая свое возбуждение. (В) Свет, падающий на соседние области в форме кольца, также приводит к тому, что уменьшается высвобождение глутамата фоторецепторами. В результате происходит гиперполяризация горизонтальной клетки, которая предотвращает высвобождение ею тормозного медиатора ГАМК на фоторецептор. Следовательно, фоторецептор, который соединен с Н-биполярный клеткой, деполяризуется (из-за уменьшения тормозного влияния), что вновь приводит к высвобождению медиатора и деполяризации биполярной клетки. При освещении рассеянным светом процессы гиперполяризации и деполяризации гасят друг друга. Таким образом, горизонтальные клетки играют ведущие роли для обеспечения характерных свойств рецептивных полей биполярных клеток.

Fig. 19.19. Connections of Photoreceptors, Bipolar Cells, and Horizontal Cells. The figure illustrates connections required to elicit responses in bipolar cells. (A) Light falling on a single photoreceptor causes it to become hyperpolarized. As a result, glutamate stops being released and the H bipolar cell, as in Figure 19.18, becomes hyperpolarized through loss of excitation. (B) Light falling on the surrounding area in the form of an annulus again prevents glutamate from being released by photoreceptors. As a result, the horizontal cell becomes hyperpolarized; this hyperpolarization prevents the horizontal cell from releasing its inhibitory transmitter, GABA, onto the photoreceptor. The photoreceptor that is connected to the H bipolar cell therefore becomes depolarized (through removal of inhibition). It once again releases glutamate and depolarizes the bipolar cell. With diffuse light, the depolarizing and hyperpolarizing effects cancel each other out. Thus, horizontal cells play an essential part in the construction of the receptive field properties of bipolar cells.

щение центрального фоторецептора очевиден (рис. 19.19А). Активация фоторецептора приводит к его гиперполяризации и, следовательно, к уменьшению высвобождения глутамата, что вызывает гиперполяризацию биполярной клетки. Горизонтальная клетка также получает стимулы к гиперполяризации, однако, так как они поступают только с одного фоторецептора, они имеют небольшой эффект, проявляющийся только в виде отрицательной обратной связи на центральный фоторецептор.

Ответы на освешение периферии (рис. 19.19В) вовлекают дополнительные механизмы. Горизонтальная клетка, получающая сигналы от нескольких фоторецепторов вокруг центральной зоны, при освещении гиперполяризуется. Гиперполяризация уменьшает высвобождение ГАМК горизонтальными клетками, что приводит к уменьшению тормозного влияния на фоторецепторы и к их деполяризации. Этот эффект деполяризации проявляется минимально по отношению к фоторецепторам периферии, так как они сами по себе гиперполяризованы освещением. Однако центральный фоторецептор не находится под освещением, и поэтому единственным влиянием на него является уменьшение ингиби-

рования со стороны горизонтальной клетки. В результате этого центральная клетка деполяризуется, увеличивается высвобождение ею глутамата, что все вместе приводит к деполяризации Н-биполярной клетки. В обзорах подробно описываются свойства терминалей фоторецепторов, терминалей биполярных клеток, а также синапсы обратной связи между горизонтальными и биполярными клетками[2, 7, 46].

Значение структуры рецептивных полей биполярных клеток

Какое же физиологическое значение имеет такая структура рецептивных полей биполярных клеток?

D- и Н-биполярные клетки не просто возбуждаются в ответ на освещение. Они начинают анализ информации об элементарных паттернах света. Сигналы биполярных клеток несут информацию о различных падающих на сетчатку пятнах света, окруженных темным полем, либо, наоборот, о темных пятнах, окруженных светом, т. е. они отвечают на контрастные паттерны света и темноты в маленькой области сетчатки.

В дополнение к уже известным нам большим категориям D- и Н-биполярных клеток имеется еще около 11 типов различных биполярных клеток, связанных с колбочками, которые различаются по морфологическим и иммуногистохимическим критериям[42]. Базируясь на них, можно получить три принципиальных типа клеток:

1. Связанные с колбочками D- и Н-биполярные клетки, лучше всего отвечающие на мельчайшие пятна света или темноты.
2. D- и Н-карликовые биполярные клетки центральной области сетчатки, образующие связи только с одной колбочкой.
3. Биполярные D-клетки, связанные с палочками центрального "on"-ответа, лучше всего реагирующие на малые яркие световые пятна.

§ 6. Рецептивные поля ганглиозных клеток

Эфферентные сигналы сетчатки

Еще за много лет до того, как от фоторецепторов и биполярных клеток сетчатки могли быть отведены электрические ответы, важная информация была получена при регистрации сигналов от ганглиозных клеток. В этих экспериментах был осуществлен первый анализ выходных сигналов в сетчатке, являющихся результатом происходящих там синаптических взаимодействий. Преимуществом изучения ганглиозных клеток является то, что их сигналы являются потенциалами действия и функционируют по принципу «все или ничего». Поэтому было возможно проведение регистрации сигнала при помощи внеклеточного электрода в то время, когда внутриклеточные электроды еще не существовали и пока не были разработаны соответствующие красители. Кроме того, простыми и удобными для изучения делало их то, что отростки ганглиозных клеток направляются из сетчатки в ЦНС. Именно на них были впервые описаны концентрические поля с "on"- и "off"-центрами. И именно они помогли потом понять смысл сигналов, регистрируемых на горизонтальных и биполярных клетках.

Стивен Куффлер был первым, кто выполнил экспериментальные исследования зрительной системы млекопитающих, обратив внимание на структуру рецептивных полей и их значение для зрительной сигнализации у кошки[64]. В его экспериментах главный интерес состоял в конечных результатах синаптических взаимодействий, нежели в самих синаптических механизмах. Хьюбель[65] впоследствии высоко оценил перспективы таких исследований:

> *Что особенно для меня интересно — это неожиданность результатов, поскольку никто до Куффлера не дошел до предположения о существовании рецептивных полей в виде структуры «центр — периферия» и что зрительный нерв фактически игнорирует любой раздражитель в виде рассеянного света любой интенсивности.*

Принципиально новый подход был обусловлен не только новой техникой исследования, скорее, он обусловлен четкой формулировкой следующего вопроса: каким образом лучше всего стимулировать отдельную ганглиозную клетку? Ответ на этот вопрос привел к использованию отдельных кольцевидных световых пятен для стимулирования отдельных зон сетчатки вместо однородного диффузного освещения. Эти исследования предвосхитили пионерские работы по исследованию глаза простых беспозвоночных: мечехвоста *Limulus*[54] и сетчатки лягушек[66, 67].

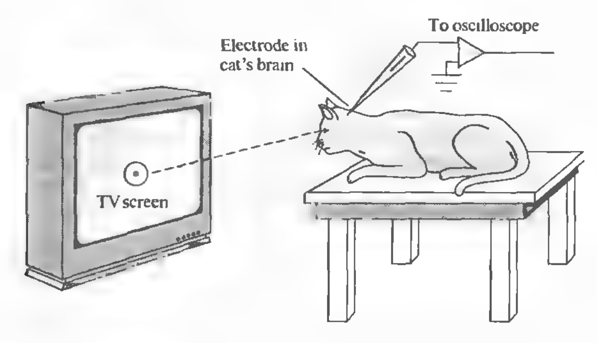


Рис. 19.20. Стимуляция сетчатки при помощи различных световых образов. Адаптировавшиеся глаза кошки или обезьяны, находящейся под наркозом, направляют в сторону кино- или телевизионного экрана, на котором показаны различные световые образы, генерируемые компьютером и/или спроецированные проектором. При этом при помощи электрода регистрируют ответы отдельного нейрона путей зрительного анализатора. Световые пучки, возникающие в определенной области экрана, увеличивают или уменьшают частоту разрядов данного нейрона. Таким образом может быть очерчено рецептивное поле этой клетки при помощи определения границ зон на экране, представление которых вызывает изменение частоты импульсации. В оригинальных экспериментах Kuffler направлял свет прямо в глаз при помощи специально сконструированного офтальмоскопа.

Fig. 19.20. Stimulation of Retina with Patterns of Light. The eyes of an anesthetized, light-adapted cat or monkey focus on a movie or a television screen with various patterns of light generated by a computer or shone by a projector. An electrode records the responses from a single cell in the visual pathway. Light or shadow falling onto a restricted area of the screen may increase or decrease the frequency of signals given by the neuron. One can delineate the receptive field of the cell by determining the areas on the screen from which the neuron's firing is influenced. In his original experiments, Kuffler shone light directly into the eye by means of a specially constructed ophthalmoscope.

Изначальный выбор Куффлером глаза кошки был удачным: у кролика, к примеру, ситуация гораздо более сложная. Ганглиозные клетки сетчатки кролика имеют рецептивные поля, тонко реагирующие на такие сложные элементы, как края светового пятна и определенное направление его движения[68]. Также сложны эти механизмы и у низших позвоночных, таких как лягушки. Можно выявить общую закономерность: чем глупее животное, тем умнее у него сетчатка (Д. А. Бейлор, личное сообщение).

Использование дискретных зрительных стимулов для определения рецептивных полей

Главной особенностью ранних экспериментов Куффлера было использование интактного нерассеченного глаза, нормальная рефракция которого использовалась для стимуляции определенных зон сетчатки[64]. Удобным методом освещения отдельных отделов сетчатки является общая анестезия животного и помещение его перед телевизионным экраном на расстоянии, на котором его глазом осуществляется нормальная рефракция. При этом при появлении на экране монитора отдельных вспышек, светящихся паттернов или созданного компьютером изображения оно хорошо фокусируется на поверхности сетчатки (рис. 19.20).

Организация рецептивных полей ганглиозных клеток

При регистрации сигналов от одной ганглиозной клетки прежде всего важно найти границы ее рецептивного поля. Характерной особенностью большинства ганглиозных клеток и нейронов зрительной системы является то, что они периодически дают редкие разряды в покое, даже при отсутствии освещения. Соответствующие световые стимулы не обязательно вызывают активизацию ганглиозных клеток, они могут просто модулировать спонтанную импульсацию; при этом ганглиозные клетки отвечают либо увеличением, либо уменьшением частоты сигналов.

На рис. 19.21 показано, что для ганглиозной клетки маленькое пятнышко света 0,2 мм в диаметре, спроецированное в определенную зону рецептивного поля, способно гораздо лучше вызывать возбуждение, чем рассеянный свет. Более того, то же самое пятнышко света может вызывать и противоположные эффекты, в зависимости от его положения в пределах рецептивного поля. Например, одна зона пятна света возбуждает ганглиозную клетку в течение всего времени освещения. Такого типа "on"-ответ может быстро перейти в "off"-ответ при помощи простого смещения пятна вдоль поверхности сетчатки на 1 мм или менее. Как и в случае биполярных клеток, существуют два основных типа рецептивных полей ганглиозных клеток: имеющие ре-

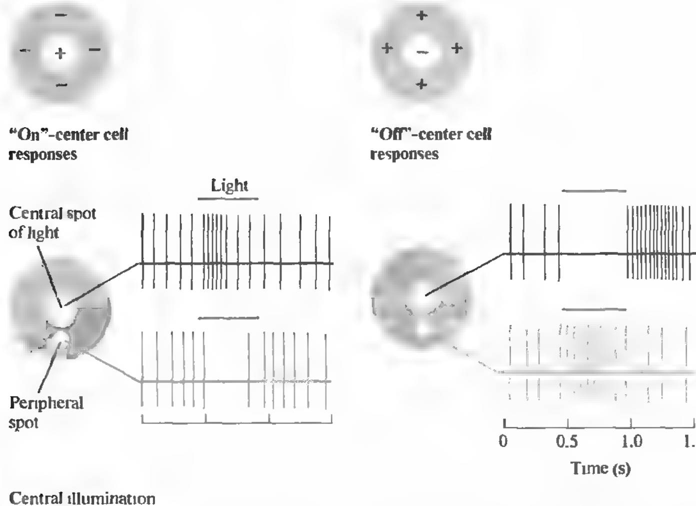


Рис. 19.21. Рецептивные поля ганглиозных клеток сетчаток кошки и обезьяны, сгруппированные в два основных класса: поля с "on"- и поля с "off"-центрами. Клетки с "on"-центральными полями наиболее чувствительны к пятнам света, проецирующимся на центральную зону рецептивного поля. Освещение (показано в виде полоски над сигналами) окружающей области вместе с пятном, а также освещение в виде кольца уменьшают или полностью подавляют разряды, появляющиеся вновь при выключении света. Освещение всего рецептивного поля вызывает слабые ответы из-за того, что центр и окружение проявляют антагонистические эффекты вместе с биполярной клеткой. Клетки с "off"-центральными полями уменьшают или прекращают посылать сигналы при освещении центральных зон их рецептивных полей и активируются при выключении света. Свет, падающий на окружающие зоны рецептивных полей с "off"-центром, вызывает возбуждение нейрона.

Fig. 19.21. Receptive Fields of Ganglion Cells in the retinas of cats and monkeys are grouped into two main classes: "on"-center and "off"-center fields. "On"-center cells respond best to a spot of light shone onto the central part of the receptive field. Illumination (indicated by the red bar above records) of the surrounding area with a spot or a ring of light reduces or suppresses the discharges and causes responses when the light is turned off. Illumination of the entire receptive field elicits weak discharges because center and surround antagonize each other's effects, as with bipolar cells. "Off"-center cells slow down or stop signaling when the central area of their field is illuminated and accelerate when the light is turned off. Light shone onto the surround of an "off"-center receptive field causes excitation of the neuron. (After Kuffler, 1953.)

цептивные поля с "on"- и "off"-центрами. Рецептивные поля обоих типов имеют приблизительно концентрическую форму.

В случае рецептивных полей с "on"-центром свет вызывает наиболее сильный ответ в том случае, если световое пятно полностью заполняет центр, в то время как для наиболее эффективного угнетения импульсации свет должен покрыть всю периферию в виде кольца (случай кольцевидного освещения показан на рис. 19.21). При выключении угнетающего активность кольцевидного освещения ганглиозная клетка отвечает дополнительным "off"-разрядом. Рецептивные поля с "off"-центром имеют противоположное строение: угнетение происходит при освещении центральной зоны. Для обоих типов зон эффекты света на центр и на периферию антагонистичны. Таким образом, если и центр, и периферия одновременно освещаются, эффекты стремятся погасить друг друга.

Размеры рецептивных полей

Соседние ганглиозные клетки собирают информацию от сходных, но не полностью одинаковых областей сетчатки. Даже малейшие (0,1 мм) пятна света на сетчатке покрывают рецептивные поля множества ганглиозных клеток. Некоторые из них при этом ингибируются, другие — возбуждаются. Эта характерная структура, когда соседние группы фоторецепторов посылают свои отростки к соседним ганглиозных клеткам сетчатки, сохраняется на всех уровнях зрительной системы. Во всех отделах нервной системы систематический анализ расположения клеток и их рецептивных полей демонстрирует общий принцип, что *нейроны, обрабатывающие сходную информацию, расположены близко друг от друга*. В сенсорных системах это означает, что центральные нейроны, связанные с определенной зоной поверхности, могут взаимодействовать друг с другом в пределах коротких дистанций. Это является удачным решением, так как позволяет «экономить» на длинных связях и упрощает их образование (глава 17).

Размер рецептивного поля ганглиозной клетки зависит от ее расположения в сетчатке. Рецептивные поля клеток, расположенных в центральных зонах сетчатки, имеют гораздо меньшие по размеру центры, чем на периферии; рецептивные поля имеют наименьший размер в области зрительной ямки, где острота зрения максимально высока[69, 70]. Центральные “on”- и “off”-регионы некоторых ганглиозных клеток, таких как «карликовые» клетки, могут быть образованы всего одной колбочкой, имеющей около 2,5 мкм в диаметре, что составляет 0,5 минуты оптической дуги — меньше, чем одна типографская точка, стоящая в конце данного предложения. Важно отметить, что рецептивные поля могут быть описаны и как зоны сетчатки определенных размеров, так и при помощи угловых величин оптической дуги стимула. В наших глазах 1 мм сетчатки соответствует углу порядка 4 градусов. Для сравнения: изображение луны занимает на сетчатке около 1/8 мм, что соответствует 0,5 градуса или 30 минутам.

Подобные градации характерны также для рецептивных полей в отношении дискриминационной чувствительности и разрешения в зрительной и соматосенсорной системах. Сенсорный нейрон более высокого порядка в головном мозгу, отвечающий за легкое прикосновении к кончику пальца, имеет рецептивное поле гораздо меньшее по размеру по сравнению с нейронами, иннервирующими кожу других областей верхней конечности (глава 18). Поэтому для определения контуров объекта мы используем либо кончики наши пальцев, либо зрительную ямку глаза, а не другие области, способность которых к дискриминации ниже из-за более низкого разрешения их рецептивной поверхности.

Классификация ганглиозных клеток

Базируясь на общей схеме рецептивных полей с “on”- и “off”-центрами, ганглиозные клетки сетчатки обезьяны могут быть сгруппированы в 2 основные категории, названные М- и Р-клетками. Критериями для подобной классификации служат физиологические и анатомические особенности. Терминология М- и Р-клеток основана на анатомических особенностях образования ими связей с латеральным коленчатым ядром и затем с корковыми структурами (глава 20). Р-ганглиозные клетки посылают свои отростки к четырем дорзальным слоям небольших по размеру клеток, входящих в латеральное коленчатое тело (в его мелкоклеточную часть), М-ганглиозные клетки — к большим клеткам, расположенным в двух передних слоях (крупноклеточная часть). Характеристики нейронов, образующих М- и Р-пути, сохраняются на всех последующих уровнях зрительной системы. Р-ганглиозные клетки имеют рецептивные поля с небольшим центром и высокое пространственное разрешение, а также они чувствительны к цвету. Р-клетки несут информацию о тонких и высококонтрастных деталях объектов[71]. М-клетки имеют большие по размеру рецептивные поля и более чувствительны к малым изменениям контрастности и движению; они посылают импульсы высокой частоты и проводят импульсы быстрее по аксонам большого диаметра. У кошки, которая не имеет цветового зрения, имеется другая классификация ганглиозных клеток, где выделяют группы X-, Y- и W-клеток[72]. X- и Y- по определенным свойствам сходны с Р- и М-клетками, однако, есть и существенные различия, которые не позволяют объединить эти классификации[73]. Классификация на мелко- и крупноклеточные в зрительной системе обеспечивает удобную и наглядную

основу для дальнейшего изучения проводящих путей зрительного анализатора.

Синаптические входы на ганглиозные клетки, определяющие организацию рецептивных полей

Синаптические сигналы передаются на ганглиозные клетки с биполярных и амакриновых клеток в области внутреннего плексиформного слоя (см. рис. 19.15). Полное описание этих удивительных связей между фоторецепторами и ганглиозными клетками дано в основательном обзоре Стерлинга[2].

Как и ожидалось, деполяризующиеся биполярные клетки колбочек с "on"-центром и гиперполяризующиеся с "off"-центром образуют химические синапсы с соответствующими ганглиозными клетками, имеющими "on"- и "off"-поля. Эти синапсы являются возбуждающими, следовательно, изменение мембранного потенциала на биполярной клетке приводит к пропорциональному изменению в ту же сторону потенциала связанной с нею ганглиозной клетки. Передача сигнала от палочек к ганглиозным клеткам не столь проста. Одним из путей являются биполярные клетки палочек, которые, в свою очередь, связаны с особыми амакриновыми клетками (так называемыми А2 амакриновыми клетками)[74]–[76]. Соединения бывают настолько плотны, что палочки и колбочки одной и той же части сетчатки передают сигнал на одну ганглиозную клетку, но через различные промежуточные клетки.

Эффективность работы всей этой сложной цепочки по передаче сигналов от отдельного фоторецептора до ганглиозной клетки была элегантно продемонстрирована Бейлором и Феттиплейсом[77]. Они изменяли мембранный потенциал отдельного фоторецептора при помощи внешнего тока, подаваемого через внутриклеточный электрод. Одновременно с этим они регистрировали активность ганглиозной клетки, с которой связан фоторецептор посредством биполярных, горизонтальных и амакриновых клеток. Гиперполяризация одного фоторецептора (колбочки, чувствительной к красному свету) изменяла импульсацию в ганглиозной клетке. Этот эксперимент наглядно показал, что гиперполяризация и деполяризация одного фоторецептора достаточна для передачи информации о свете другим клеткам в ЦНС.

Что за информацию передают ганглиозные клетки?

Наиболее удивительной особенностью сигналов ганглиозных клеток является то, что они передают совсем не ту информацию, что первичные фоторецепторные клетки. Они не передают информацию об абсолютном уровне освещения, ибо они отвечают сходными сигналами на различные уровни фонового освещения. Они игнорируют большую часть информации от фоторецепторов, работа которых напоминает фотопластинку или люксметр. Они, скорее, измеряют различия света в пределах своих рецептивных полей, сравнивая уровни освещенности в центре и на периферии. Особенно хорошо они подходят для восприятия резких световых контрастов и игнорирования постепенных изменений общей освещенности. Они удивительным образом настроены на выявление контрастов, образующихся на границах контуров изображения, пересекающего разные области нескольких рецептивных полей.

Эксперименты, проведенные на сетчатке саламандры Бейлором, Мейстером и их коллегами позволяют предполагать, что временные особенности активности ганглиозных клеток могут играть определенную роль в пространственном разрешении передаваемого в ЦНС сигнала[78, 79]. На протяжении всей нашей дискуссии активность отдельных нейронов рассматривалась как несвязанные наборы сигналов, анализ которых на предмет закодированной зрительной информации осуществляется в ЦНС. Синхронизация активности двух клеток может, однако, служить дополнительным параметром для анализа[80]. При регистрации сигналов одновременно от нескольких ганглиозных клеток соседних близкорасположенных зон была обнаружена высокая степень синхронизации при определенных зрительных стимулах, которая отсутствовала при других стимулах. Синхронизация частоты потенциалов действия в парах ганглиозных клеток критически зависела от размера и расположения пятна света. Например, стимуляция при помощи двух пятнышек света двух ганглиозных клеток с "off"-центром, имеющих перекрывающиеся центры полей, приводит к активности в обеих клетках. Для того чтобы обе клетки посылали сигналы синхронно, необходимо, чтобы пучок света был меньше, чем рецептивные поля обеих ганглиозных клеток и чтобы пятно накрывало границу двух рецептивных полей.

В принципе, анализ степени синхронизации для получения информации об освещении сетчатки может быть реализован в более высоких центрах ЦНС, о чем можно косвенно судить при рассмотрении активности двух ганглиозных клеток по отдельности. Известно, что синхронизованность входящих синаптических сигналов способствует значительной интеграции информации, однако пока не известно, использует ли в действительности ЦНС этот параметр при анализе информации об активности ганглиозных клеток.

Нам кажется уместным закончить эту главу цитатой из работы Шеррингтона. Эти слова были им написаны задолго до того, как было найдено первое рецептивное поле отдельной клетки сетчатки. В отличие от Гельмгольца немного туманный стиль Шеррингтона зачастую затрудняет чтение его глубоко оригинальных статей и книг. Следующий абзац также показывает нам поэтичность его взгляда на физиологию зрения[81]:

> *К самому изумительному чуду на свете мы еще даже и не прикоснулись. К чуду из чудес, знакомому нам всю жизнь. Оно настолько срослось с нами, что мы все время забываем о нем. А ведь наш глаз, ва времл того, как мы смотрим, на протяжении всего дня посылает в густой лес клеток и волокон нашего мозга постаянные ритмические потоки мельчайших, отделенных друг от друга, эфемерных электрических потенциалов. Эта пульсирующая и текущая па губчатой структуре мозга компания электрических разрядов не имеет никаких видимых признаков сходства с пространственной или временной структурой окружающего мира; она лишь отдаленно напоминает ту крошечную двумерную и, вдобавок, перевернутую картинку окружающего мира, которая возникает в глазу в самом начале нервных волокон, до шторма электрических разрядов. И этот шторм разрядов устроен таким образом, что влияет на работу клеток мозга всех типов. Электрические разряды, сами по себе не несущие даже малейшей зрительной информации, не имеющие, например, ничего общего с такими понятиями, как «расстояние», «право-лево», ни с «вертикальный» или «горизонтальный», ни с «цветом», «яркостью» или «тенью», ни с «округлостью», «квадратностью», ни с «контуром», с «прозрачностью» или «непрозрачностью», ни с понятиями «далеко» или «близко», вообще ничего с какой-либо зрительной информацией — тем не менее позволяют нам, словно по волшебству, представить все это. Ливень маленьких разрядов вызывает в моем воображении, когда я смотрю вокруг, панораму окружающего меня места: замок на холме или лицо какого-то моего друга, как далеко они от меня — обо всем об этом мне говорят эти потенциалы. Следуя их словам, я иду вперед, и другие мои чувства подтверждают, что они находятся именно там, где я и предпологал.*

Выводы

- Палочки и колбочки способны реагировать на освещение ярким и слабым светом.
- Зрительные пигменты плотно упакованы в мембранах палочек и колбочек.
- Передача сигнала происходит в несколько этапов, с участием G-белка и цГМФ.
- В темноте фоторецепторы деполяризованы и постоянно высвобождают медиатор глутамат.
- Свет приводит к закрытию управляемых цГМФ катионных каналов, гиперполяризации и уменьшению высвобождения глутамата.
- Два основных класса биполярных клеток реагируют на глутамат, высвобождаемый фоторецепторами.
- Н-биполярные клетки деполяризованы в темноте и гиперполяризуются на свету.
- D-биполярные клетки гиперполяризованы в темноте и деполяризуются на свету.
- Рецептивные поля соответствуют зрительным полям или участкам сетчатки, освещение которых вызывает сигналы в клетках зрительной системы.
- Фоторецепторы, горизонтальные клетки и биполяры не способны генерировать потенциал действия.
- Ганглиозные и амакриновые клетки генерируют потенциал действия.
- Биполярные и ганглиозные клетки имеют концентрические рецептивные поля, с “on”- и “off”-центрами и противоположной по функции периферией.
- Ганглиозные клетки плохо отвечают на рассеянный свет.
- Большие ганглиозные клетки, известные как magnocellular или М-клетки, имеют большие рецептивные поля и хорошо отвечают на движение.
- Малые ганглиозные клетки, называемые parvocellular или Р-клетки, имеют небольшие рецептивные поля и способны воспринимать цвет и тонкие детали.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Baylor, D. 1996. How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 540–565.
- Boycott, B., and Wässle, H. 1999. Parallel processing in the mammalian retina: The Proctor Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: 1313–1327.
- Dowling, J. E. 1987. *The Retina: An Approachable Part of the Brain.* Harvard University Press,
- Cambridge, MA.
- Finn, J. T., Grunwald, M. E., and Yau, K-W. 1996. Cyclic nucleotide-gated ion channels: An ex-tended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.*58: 395–426.
- Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata, S., and Okada, M. 1998. Glutamate receptors: Brain function and signal trans-duction.
- *Brain Res. Rev.* 26: 230–235.
- Nathans, J. 1989. The genes for color vision. *Sci. Am.* 260(2): 42–49.
- Sterling, P. 1997. Retina. In G. M. Shepherd (ed.), *Synaptic Organization of the Brain.* Oxford University Press, New York, Chapter 6.
- Stryer, L. 1991–1992. Molecular mechanism of visual excitation. *Harvey Lect.* 87: 129–143.

Статьи

- Baylor, D. A., Lamb, T. D., and Yau, K. W. 1979. The membrane current of single rod outer segments. *J. Physiol.* 288: 589–611.
- Boycott, B. B., and Dowling, J. E. 1969. Organization of primate retina: Light microscopy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 255: 109–184.
- Chen, J., Makino, C. L., Peachey, N. S., Baylor, D. A., and Simon, M. I. 1995. Mechanisms of rhodopsin inactivation in vivo as revealed by a COOH-terminal truncation mutant. *Science* 267: 374–377.
- Croner, L. J., and Kaplan, E. 1995. Receptive fields of P and M ganglion cells across the primate retina. *Vision Res.* 35: 7–24.
- Finn, J. T., Xiong, W. H., Solessio, E. C., and Yau, K. W. 1998. A cGMP-gated cation channel and phototransduction in depolarizing photoreceptors of the lizard parietal eye. *Vision Res.* 38: 1353–1357.
- Kaneko, A. 1970. Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *J. Physiol.* 207: 623–633.
- Kaneko, A., Delavilla, P., Kurahashi, T., and Sasaki, T. 1994. Role of L-glutamate for formation of on-responses and off-responses in the retina. *Biomed. Res.* 15 (Suppl. 1): 41–45.
- Kuffler, S. W. 1953. Discharge patterns and functional organization of the mammalian retina. *J. Neurophysiol.* 16: 37–68.
- Meister, M., Lagnado, L., and Baylor, D. A. 1995. Concerted signaling by retinal ganglion cells. *Science* 270: 1207–1210.
- Schnapf, J. L., Kraft, T. W., Nunn, B. J., and Baylor, D. A. 1988. Spectral sensitivity of primate photoreceptors. *Vis. Neurosci.* 1: 255–261.

Цитированная литература

1. Boycott, B. B., and Dowling, J. E. 1969. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 255: 109–184.
2. Sterling, P. 1997. Retina. In *Synaptic Organization of the Brain.* Oxford Universiiy Press, New York, Chapter 6.
3. Hecht, S., Shlaer, S., and Pirenne, M. H. 1942. *J. Gen. Physiol.* 25: 819–840.
4. Helmholtz, H. von. 1962/1927. *Helmholtz's Treatise on Physiological Optics.* Dover, New York.
5. Fuortes, M. G. F., and Poggio, G. F. 1963. *J. Gen. Physiol.* 46: 435–452.
6. Baylor, D. A., Fuortes, M. G. F., and O'Bryan, P. M. 1971. *J. Physiol.* 214: 265–294.
7. Dowling, J. E. 1987. *The Retina: An Approachable Part of the Brain.* Harvard University Press, Cambridge, MA.
8. Brown, P. K., and Wald, G. 1963. *Nature* 200: 37–43.
9. Marks, W. B., Dobelle, W. H., and MacNichol, E. F. 1964. *Science* 143: 1181–1183.
10. Matthews, R. G., et al. 1963. *J. Gen. Physiol.* 47: 215–240.
11. Pepperberg, D. R., et al. 1993. *Mol. Neurobiol.* 7: 61–85.
12. Nathans, J., and Hogness, D. S. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4851–4855.
13. Baylor, D. A. 1987. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 34–49. 19Baylor, D. A., and Fuortes, M. G. F. 1970. *J. Physiol.* 207: 77–92.
14. Dartnall, H. J. A., Bowmaker, J. K., and Molino, J. D. 1983. *Proc. R. Soc. Lond. B* 220: 115–130.
15. Schnapf, J. L., et al. 1988. *Vis. Neurosci.* 1: 255–261.
16. Nathans, J. 1987. *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 163–194.
17. Nathans, J. 1989. *Sci. Am.* 260(2): 42–49.
18. Nathans, J. 1999. *Neuron* 24: 299–312.
19. Baylor, D. A., and Fuortes, M. G. F. 1970. *J. Physiol.* 207: 77–92.

20. Baylor, D. A., Lamb, T. D., and Yau, K. W. 1979. *J. Physiol.* 288: 589–611.
21. Yau, K. W., and Chen, T. Y. 1995. In *Handbook of Receptors and Channels: Ligand- and Voltage-Gated Ion Channels.* CRC Press, Boca Raton, FL, p. 307–335.
22. Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S., and Lyubarsky, A. L. 1985. *Nature* 313: 310–313.
23. Yau, K. W., and Nakatani, K. 1985. *Nature* 317: 252–255.
24. Stryer, L., and Bourne, H. R. 1986. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2: 391–419.
25. Torre, V., et al. 1995. *J. Neurosci.* 15: 7757–7768.
26. Kaupp, U. B. 1995. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 434–442.
27. Finn, J. T., Grunwald, M. E., and Yau, K-W. 1996. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 395–426.
28. Bucossi, G., Nizzari, M., and Torre, V. 1997. *Biophys. J.* 72: 1165–1181.
29. Stryer, L. 1987. *Sci. Am.* 257(1): 42–50.
30. Stryer, L. 1991–1992. *Harvey Lect.* 87: 129–143.
31. Finn, J. T., Solessio, E. C., and Yau, K. W. 1997. *Nature* 385: 815–819.
32. Finn, J. T., et al. 1998. *Vision Res.* 38: 1353–1357.
33. Fain, G. L., Matthews, H. R., and Cornwall, M. C. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 502–507.
34. Baylor, D. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 540–565.
35. Koutalos, Y., and Yau, K. W. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 73–81.
36. Morgans, C. W., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 2467–2474.
37. Baylor, D. A., and Burns, M. E. 1998. *Eye* 12. 521–525.
38. Chen, J., et al. 1995. *Science* 267: 374–377.
39. Schnapf, J. L., and Baylor, D. A. 1987. *Sci. Am.* 256(4): 40–47.
40. Rieke, F., and Baylor, D. A. 1998. *Biophys. J.* 75: 1836–1857.
41. Baylor, D. A., and Hodgkin, A. L. 1973. *J. Physiol.* 234: 163–198.
42. Boycott, B., and Wässle, H. 1999. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: 1313–1327.
43. Strettoi, E., and Masland, R. H. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14906–14911.
44. Kolb, H. 1997. *Eye* 11: 904–923.
45. MacNeil, M. A., et al. 1999. *J. Comp. Neurol.* 413: 305–326.
46. Wässle, H., et al. 1998. *Vision Res.* 38: 1411–1430.
47. Brandstatter, J. H., Koulen, P., and Wässle, H. 1988. *Vision Res.* 38: 1385–1397.
48. Pourcho, R. G. 1996. *Curr. Eye Res.* 15: 797–803.
49. Qian, H., et al. 1997. *J. Neurophysiol.* 78: 2402–2412.
50. Herbst, H., and Their, P. 1996. *Exp. Brain Res.* 111: 345–355.
51. Raviola, E., and Wiesel, T. N. 1990. *Ciba Found. Symp.* 155: 22–38.
52. Vardi, N., et al. 1998. *Vision Res.* 38: 1359–1369.
53. von Gersdorff, H., et al. 1996. *Neuron* 16: 1221–1227.
54. Hartline, H. K. 1940. *Am. J. Physiol.* 130: 690–699.
55. Kaneko, A., and Hashimoto, H. 1969. *Vision Res.* 9: 37–55.
56. Kikkawa, S., et al. 1993. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 374–379.
57. Kaneko, A., et al. 1994. *Biomed. Res.* 15 (Suppl. 1): 41–45.
58. Nakanishi, S., et al. 1998. *Brain Res. Rev.* 26: 230–235.
59. Kaneko, A. 1971. *J. Physiol.* 213: 95–105.
60. Kaneko, A., and Tachibana, M. 1986. *J. Physiol.* 373: 443–461.
61. Schwartz, E. A. 1987. *Science* 238: 350–355.
62. Yang, X. L., Gao, F., and Wu, S. M. 1999. *Vis. Neurosci.* 16: 967–979.
63. Savchenko, A., Barnes, S., and Kramer, R. H. 1997. *Nature* 390: 694–698.
64. Kuffler, S. W. 1953. *J. Neurophysiol.* 16: 37–68.
65. Hubel, D. H. 1988. *Eye, Brain and Vision.* Scientific American Library, New York.
66. Barlow, H. B. 1953. *J. Physiol.* 119: 69–88.
67. Maturana, H. R., et al. 1960. *J. Gen. Physiol.* 43: 129–175.
68. Barlow, H. B., Hill, R. M., and Levick, W. R. 1964. *J. Physiol.* 173: 377–407.
69. Kier, C. K., Buchsbaum, G., and Sterling, P. 1995. *J. Neurosci.* 15: 7673–7683.
70. Croner, L. J., and Kaplan, E. 1995. *Vision Res.* 35: 7–24.
71. Kaplan, E., and Shapley, R. M. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2755–2757.
72. Enroth-Cugell, C., and Robson, J. G. 1966. *J. Physiol.* 187: 517–552.
73. Benardete, E. A., Kaplan, E., and Knight, B. W. 1992. *Vis. Neurosci.* 8: 483–486.
74. Daw, N. W., Jensen, R. J., and Brunken, W. J. 1990. *Trends Neurosci.* 13: 110–115.
75. Dacheux, R. F., and Raviola, E. 1986. *J. Neurosci.* 6: 331–345.
76. Soucy, E., et al. 1998. *Neuron* 21: 481–493.
77. Baylor, D. A., and Fettiplace, R. 1977. *J. Physiol.* 271: 391–424.
78. Meister, M., Lagnado, L., and Baylor, D. A. 1995. *Science* 270: 1207–1210.
79. Meister, M., and Berry, M. J., II 1999. *Neuron* 22: 435–450.
80. Maffei, L., and Galli-Resta, L. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2861–2964.
81. Sherrington, C. S. 1951. *Man on His Nature.* Cambridge University Press, Cambridge.

Глава 20

Кодирование сигнала в латеральном коленчатом теле и первичной зрительной коре

Ганглиозные клетки сетчатки проецируют свои отростки в латеральное коленчатое тело, где они формируют *ретинотопическую карту*. У млекопитающих латеральное коленчатое тело состоит из 6 слоев, каждый из которых иннервируется либо одним, либо другим глазом и получает сигнал от различных подтипов ганглиозных клеток, образующих слои крупноклеточных (magnocellular), мелкоклеточных (parvocellular) и кониоклеточных*) (koniocellular) нейронов. Нейроны латерального коленчатого тела имеют рецептивные поля типа «центр-фон», подобно ганглиозным клеткам сетчатки.

Нейроны латерального коленчатого тела проецируются и формируют ретинотопическую карту в первичной зрительной коре V_1, также называемой «зоной 17» или полосатой корой (striate cortex). Рецептивные поля кортикальных клеток, вместо уже привычной организации рецептивных полей по типу «центр-фон», состоят из линий, или краев, что является принципиально новым шагом в анализе зрительной информации. Шесть слоев V_1 имеют особенности строения: афферентные волокна из коленчатого тела заканчиваются в основном в слое 4 (и некоторые в слое 6); клетки в слоях 2, 3 и 5 получают сигналы от кортикальных нейронов. Клетки слоев 5 и 6 проецируют отростки в подкорковые области, а клетки 2 и 3 слоя — в другие корковые зоны. Каждая вертикальная колонка клеток функционирует как модуль, получая исходный зрительный сигнал от определенного места в пространстве и посылая переработанную зрительную информацию во вторичные зрительные зоны. Колоночная организация зрительной коры очевидна, так как локализация рецептивных полей остается одинаковой на протяжении всей глубины коры, и зрительная информация от каждого глаза (правого или левого) всегда обрабатывается строго определенными колонками.

Было описано два класса нейронов в области V_1, которые различаются по своим физиологическим свойствам. Рецептивные поля *простых* клеток удлинены и содержат сопряженные "on"- и "off"-зоны. Поэтому наиболее оптимальным стимулом для простой клетки является особым образом ориентированные пучки света или тени. *Сложная* клетка отвечает на определенным образом ориентированную полоску света; эта полоска может находиться в любой области рецептивного поля. Возникающее в результате распознавания изображения ингибирование простых или сложных клеток несет еще более детализированную информацию о свойствах сигнала, такую как наличие линии определенной длины или определенного угла в пределах данного рецептивного поля.

Рецептивные поля простой клетки образуются в результате конвергенции значительного количества афферентов из коленчатого тела. Примыкающие друг к другу центры нескольких рецептивных полей образуют одну корковую рецептивную зону. Поле сложной клетки зависит от сигналов простой клетки и других кортикальных клеток. Последовательное изменение организации рецептивных полей от сетчатки к латеральному коленчатому телу и затем к простым и сложным кортикальным клеткам говорит об иерархии в обработке информации, посредством чего ряд нейронных конструкций одного уровня интегрируется на следующем, где на основе исходной информации формируется еще более абстрактная концепция. На всех уровнях зрительного анализатора особое внимание уделяется контрастности и определению границ изображения, а не общей освещенности глаза. Таким образом, сложные клетки зрительной коры могут «видеть» линии, являющиеся границами прямоугольника, и их мало волнует абсолютная интенсивность света внутри этого прямоугольника.

*) Konio — *греч.* пыль, мельчайшие частички. — *Прим. перев.*

Серия четких и продолжающих друг друга исследований в области механизмов восприятия зрительной информации, начатая пионерскими работами Куффлера[1] с сетчаткой, была продолжена на уровне зрительной коры Хьюбелем и Визелем. Хьюбель дал яркое описание ранних экспериментов на зрительной коре в лаборатории Стивена Куффлера в Университете Джона Хопкинса (США) в 50-х годах XX века[2]. С тех пор наше понимание физиологии и анатомии коры больших полушарий значительно развилось благодаря экспериментам Хьюбеля и Визеля, а также благодаря большому количеству работ, для которых их исследования были отправной точкой или источником вдохновения. Наша цель — дать краткое, повествовательное описание кодирования сигнала и архитектуры коры в аспекте восприятия, основанное на классических работах Хьюбеля и Визеля, а также на более поздних экспериментах, выполненных ими, их коллегами, а также многими другими. В этой главе мы лишь дадим схематический набросок функциональной архитектуры латерального коленчатого тела и зрительной коры, а также их роли в обеспечении первых шагов анализа зрительных сцен: определение линий и форм на основе поступающего из сетчатки сигнала в форме «центр-фон».

При продвижении от сетчатки к латеральному коленчатому телу, а затем и к коре полушарий возникают вопросы, которые стоят вне пределов техники. В течение длительного время было общепризнанным, что для понимания функционирования любой части нервной системы необходимо знание о свойствах составляющих ее нейронов: каким образом они проводят сигналы и несут информацию, каким образом передают полученную информацию от одной клетки к другой посредством синапсов. Однако мониторинг активности только одной отдельной клетки вряд ли может быть результативным методом для изучения высших функций, где вовлечено большое количество нейронов. Аргумент, который здесь использовался и продолжает использоваться время от времени, следующий: мозг содержит около 10^{10} или более клеток. Даже самая простая задача или событие вовлекают сотни тысяч нервных клеток, расположенных в различных частях нервной системы. Каковы же шансы физиолога суметь проникнуть в суть механизма формирования сложного действия в головном мозге, если он может одновременно исследовать только одну или несколько нервных клеток, безнадежно малую долю от общего количества?

При более тщательном изучении логика подобных аргументов относительно основной сложности исследования, связанной с большим количеством клеток и сложными высшими функциями, уже не кажется такой безупречной. Как это часто происходит, появляется упрощающий принцип, открывающий новый и ясный взгляд на проблему. Ситуацию в зрительной коре упрощает то, что основные клеточные типы расположены отдельно друг от друга, в виде хорошо организованных и повторяющихся единиц. Эта повторяющаяся структура нервной ткани тесно переплетена с ретинотопической картой зрительной коры. Таким образом, соседние точки сетчатки проецируются на соседние точки поверхности зрительной коры. Это означает, что зрительная кора организована таким образом, чтобы для каждого мельчайшего сегмента зрительного поля находился набор нейронов для анализа информации и ее передачи. Кроме того, при помощи методов, которые позволяют выделить функционально связанные клеточные ансамбли, были выделены паттерны корковой организации более высокого уровня. В самом деле, архитектура коры определяет структурную основу корковой функции, поэтому новые анатомические подходы вдохновляют на новые аналитические исследования. Таким образом, прежде чем мы опишем функциональные связи зрительных нейронов, полезно вкратце резюмировать общую структуру центральных зрительных путей, начинающихся от ядер латерального коленчатого тела.

§ 1. Латеральное коленчатое тело

Волокна зрительного нерва начинаются от каждого глаза и заканчиваются на клетках правого и левого **латерального коленчатого тела (ЛКТ)** (рис. 20.1), имеющего четко различимую слоистую структуру («коленчатый» — geniculate — означает «изогнутый подобно колену»)[3]. В ЛКТ кошки можно увидеть три явных, хорошо различимых слоя клеток (A, A_1, C), один из которых (A_1) имеет сложное строение и подразделяется далее. У обезьян и других приматов, включая

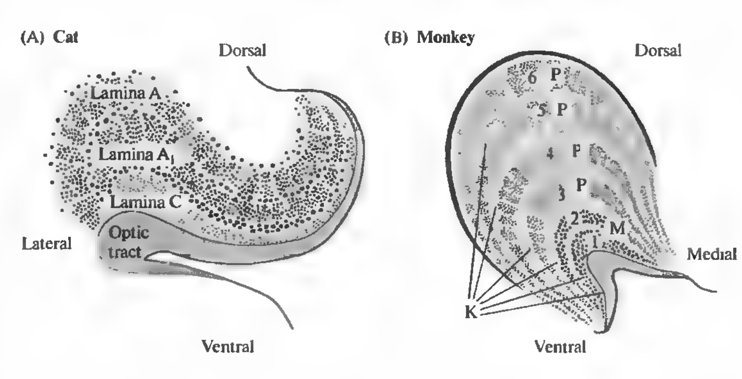


Рис. 20.1. Латеральное коленчатое тело (ЛКТ). (А) У кошки в ЛКТ имеется три слоя клеток: А, $А_1$ и С. (В) ЛКТ обезьяны имеет 6 основных слоев, включающих мелкоклеточные (parvocellular), или Р (3, 4, 5, 6), крупноклеточные (magnocellular), или М (1, 2), разделенные кониоклеточными (koniocellular) слоями (К). У обоих животных каждый слой получает сигналы только от одного глаза и содержит клетки, имеющие специализированные физиологические свойства.

Fig. 20.1. Lateral Geniculate Nucleus. (A) In cat LGN, there are three layers of cells: A, A1, and C. (B) Monkey LGN has six major layers designated parvocellular, or P (3, 4, 5, 6) and magnocellular, or M (1, 2), separated by the koniocellular (K) layers. In both animals, each layer is supplied by only one eye and contains cells with specialized response properties. (A from Szentágothai, 1973; B after Hendry and Calkins, 1998.)

человека, ЛКТ имеет шесть слоев клеток. Клетки в более глубоких слоях 1 и 2 больше по размерам, чем в слоях 3, 4, 5 и 6, из-за чего эти слои и называют соответственно **крупноклеточными** (M, magnocellular) и **мелкоклеточными** (P, parvocellular). Классификация коррелирует также с большими (М) и маленькими (Р) ганглиозными клетками сетчатки, которые посылают свои отростки в ЛКТ. Между каждым М и Р слоями лежит зона очень маленьких клеток: интраламинарный, или **кониоклеточный** (К, koniocellular) слой. Клетки К слоя отличаются от М и Р клеток по своим функциональным и нейрохимическим[4] свойствам, образуя третий канал информации в зрительную кору[5].

Как у кошки, так и у обезьяны каждый слой ЛКТ получает сигналы либо от одного, либо от другого глаза. У обезьян слои 6, 4 и 1 получают информацию от контралатерального глаза, а слои 5, 3 и 2 — от ипсилатерального*). Разделение хода нервных окончаний от каждого глаза в различные слои было показано при помощи электрофизиологических и целого ряда анатомических методов[6)—8)]. Особенно удивительным является тип ветвления отдельного волокна зрительного нерва при инъекции в него фермента пероксидазы хрена (рис. 20.2) Образо-

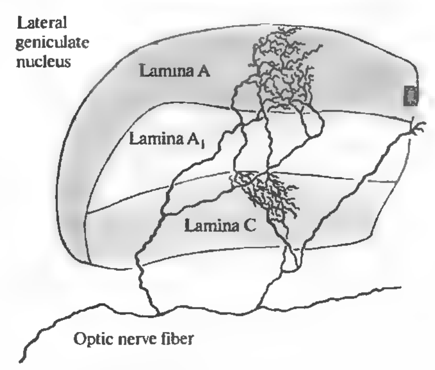


Рис. 20.2. Окончания волокон зрительного нерва в ЛКТ кошки. В один из аксонов от зоны с "on"-центром контралатерального глаза была введена пероксидаза хрена. Веточки аксона заканчиваются на клетках слоев А и С, но не $А_1$.

Fig. 20.2. Termination of an Optic Nerve Fiber in cat LGN. A single "on"-center axon from the contralateral eye was injected with horseradish peroxidase. Branches end in layers A and C, but not in A_1. (After Bowling and Michael, 1980.)

вание терминалей ограничено слоями ЛКТ для этого глаза, без выхода за границы этих слоев. Из-за систематического и определенным образом проводимого разделения волокон зрительного нерва в районе хиазмы, все рецептивные поля клеток ЛКТ расположены в зрительном поле противоположной стороны (глава 19).

*) Гомолатерального, т. е. с той же стороны. — *Прим. перев.*

Карты зрительных полей в латеральном коленчатом теле

Важной топографической особенностью является высокая упорядоченность в организации рецептивных полей в пределах каждого слоя ЛКТ. Соседние регионы сетчатки образуют связи с соседними клетками ЛКТ, так что рецептивные поля близрасположенных нейронов ЛКТ перекрываются на большой площади[4, 5]. Клетки центральной зоны сетчатки кошки (регион, где сетчатка кошки имеет маленькие по размеру рецептивные поля с малыми центрами), а также зрительной ямки обезьяны образуют связи с относительно большим количеством клеток в пределах каждого слоя ЛКТ. Подобное же распределение связей было обнаружено и у человека при помощи ЯМР[9]. Число клеток, связанных с периферическими регионами сетчатки, относительно мало. Такая избыточная представленность зрительной ямки отражает высокую плотность фоторецепторов в той зоне, которая необходима для зрения с максимальной остротой[10]. Хотя, наверное, число волокон зрительного нерва и число клеток ЛКТ примерно равны, тем не менее каждый нейрон ЛКТ получает конвергирующие сигналы от нескольких волокон зрительного нерва. Каждое волокно зрительного нерва в свою очередь образует дивергирующие синаптические связи с несколькими нейронами ЛКТ.

Однако каждый слой не только топографически упорядочен, но также и клетки разных слоев находятся в ретинотопическом отношении друг к другу. То есть, если продвигать электрод строго перпендикулярно к поверхности ЛКТ, то сначала будут регистрироваться активность клеток, получающих информацию от соответствующих зон одного, а затем и другого глаза, по мере того, как микроэлектрод пересекает один слой ЛКТ за другим. Расположение рецептивных полей находится в строго соответствующих позициях на обеих сетчатках, т. е. они представляют одну и ту же область зрительного поля[4, 5]. В клетках ЛКТ не происходит значительного смешивания информации от правого и левого глаза и взаимодействия между ними, лишь небольшое количество нейронов (которые имеют рецептивные поля в обоих глазах) возбуждаются исключительно бинокулярно.

Удивительно то, что ответы клеток ЛКТ не имеют разительных отличий от сигна-

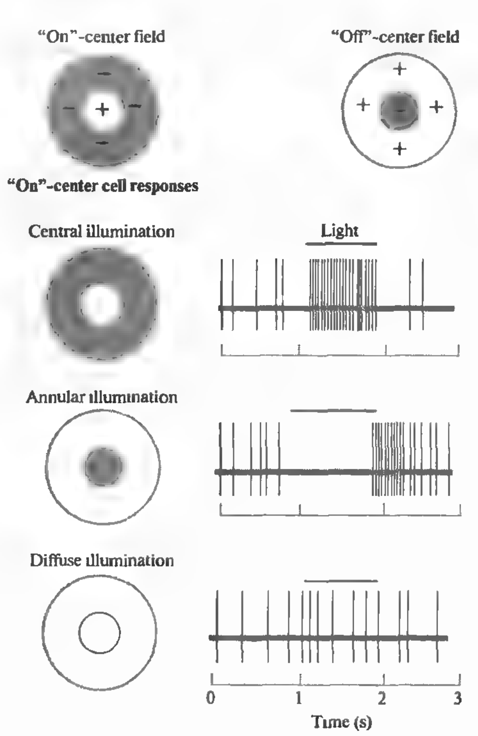
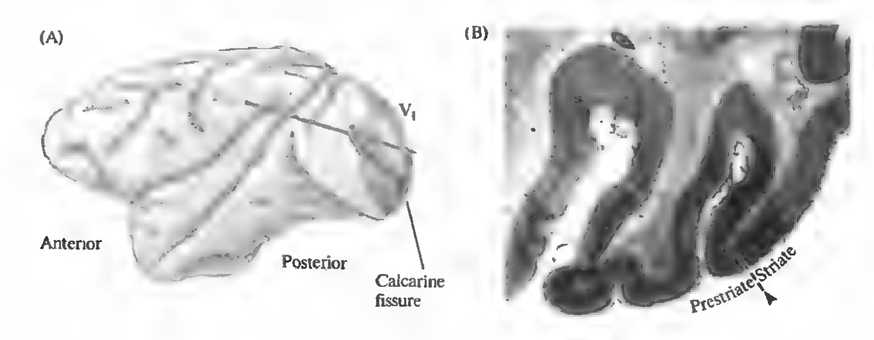


Рис. 20.3. Рецептивные поля клеток ЛКТ. Концентрические рецептивные поля клеток ЛКТ напоминают поля ганглиозных клеток в сетчатке, разделяясь на поля с "on"- и "off"-центром. Показаны ответы клетки с "on"-центром ЛКТ кошки. Полоской над сигналом показана продолжительность освещения. Центральные и периферические зоны нивелируют эффекты друг друга, поэтому диффузное освещение всего рецептивного поля дает только слабые ответы (нижняя запись), еще менее выраженные, чем в ганглиозных клетках сетчатки (сравните с рис. 19.21).

Fig. 20.3. Receptive Fields of Lateral Geniculate Nucleus Cells. The concentric receptive fields of cells in the LGN resemble those of ganglion cells in the retina, consisting of "on"-center and "off"-center types. The responses illustrated are from an "on"-center cell in cat LGN. The bar above each record indicates illumination. The central and surround areas antagonize each other's effects, so diffuse illumination of the entire receptive field gives only weak responses (bottom record), less pronounced than in retinal ganglion cells (compare Figure 19.21). (After Hubel and Wiesel, 1961.)

лов ганглиозных клеток (рис. 20.3). Нейроны ЛКТ также имеют концентрически организованные антагонизирующие рецептивные поля, либо с "off"-, либо с "on"-центром, но механизм контраста отрегулирован тоньше, за счет большего соответствия меж-



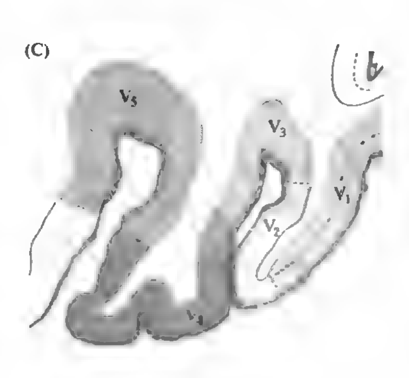


Рис. 20.4. Связь между первичной зрительной корой (V_1) и V_2, V_3, V_4 и V_5 у обезьян. (A) Плоскость среза проходит через V_1 и V_2 зоны. Четко видна граница между зонами V_1 и V_2. (B, C) Срез через затылочную кору. На B граница между V_1 и V_2 показана пунктирной линией в области, где исчезает полосатость. Границы между V_2, V_3, V_4 и V_5 зонами выявляются при помощи комбинации физиологических и морфологических исследований.

Fig. 20.4. Relation of Primary Visual Cortex (V_1) to V_2, V_3, V_4, and V_5 in the monkey. (A) The cortex and plane of section passing through V_1 and V_2. The boundary between V_1 and V_2 is unambiguous. (B, C) A section through the occipital cortex. In B, the boundary between V_1 (striate) and V_2 (prestriate) occurs at the dotted line, where the striped appearance is lost. The boundaries between V_2, V_3, V_4, and V_5 are revealed by a combination of physiological and anatomical studies. (After Zeki, 1990; micrograph kindly provided by S. Zeki and M. Rayan.)

ду тормозными и возбуждающими зонами. Таким образом, подобно ганглиозным клеткам сетчатки, для нейронов ЛКТ оптимальным стимулом является контраст, однако они реагируют еще слабее на общее освещение. Изучение рецептивных полей нейронов ЛКТ еще не завершено. Например, в ЛКТ найдены нейроны, вклад которых в работу ЛКТ не был установлен, а также пути, идущие от коры вниз к ЛКТ[11]. Корковая обратная связь необходима для синхронизированной активности нейронов ЛКТ[12)—14)].

Функциональные слои ЛКТ

Почему в ЛКТ на каждый глаз приходится больше одного слоя? Сейчас обнаружено, что нейроны в разных слоях имеют различные функциональные свойства. Например, клетки, находящиеся в четвертых дорзальных мелкоклеточных слоях ЛКТ обезьяны, подобно P ганглиозным клеткам, способны отвечать на свет разных цветов, показывая хорошую цветовую дискриминацию[15]. И наоборот, слои 1 и 2 (крупноклеточные слои) содержат M-подобные клетки, которые дают быстрые («живые») ответы и нечувствительны к цвету, в то время как K слои получают сигналы от "blue-on" ганглиозных клеток сетчатки[16] и могут играть особую роль в цветном зрении[17]. У кошек X и Y волокна (см. раздел «Классификация ганглиозных клеток» в главе 19) заканчиваются в различных подслоях A, C и A_1, поэтому специфическая инактивация слоя A, но не C, резко снижает точность глазодвижений[18]. Клетки с "on"- и "off"-центром также подразделяются на различные слои в ЛКТ норки и хорька, и, в некоторой степени, у обезьян[19)—21)]. Резюмируя вышесказанное, можно сказать, что ЛКТ является перевалочной станцией, в которой аксоны ганглиозных клеток сортируются таким образом, что соседние клетки получают сигналы от одинаковых регионов зрительных полей, и нейроны, перерабатывающие информацию, организованы в виде кластеров. Таким образом, в ЛКТ очевидной является анатомическая база для параллельной переработки (parallel processing) зрительной информации.

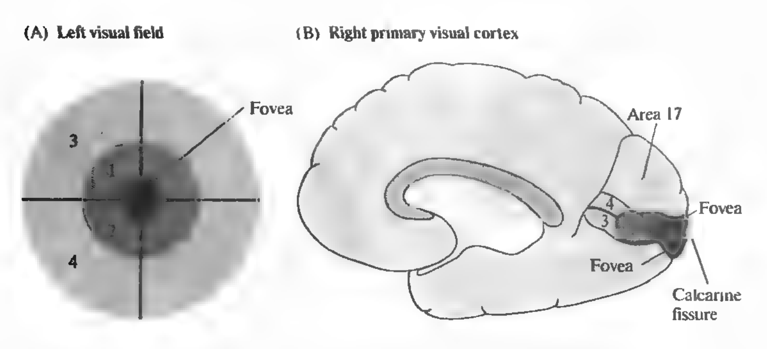


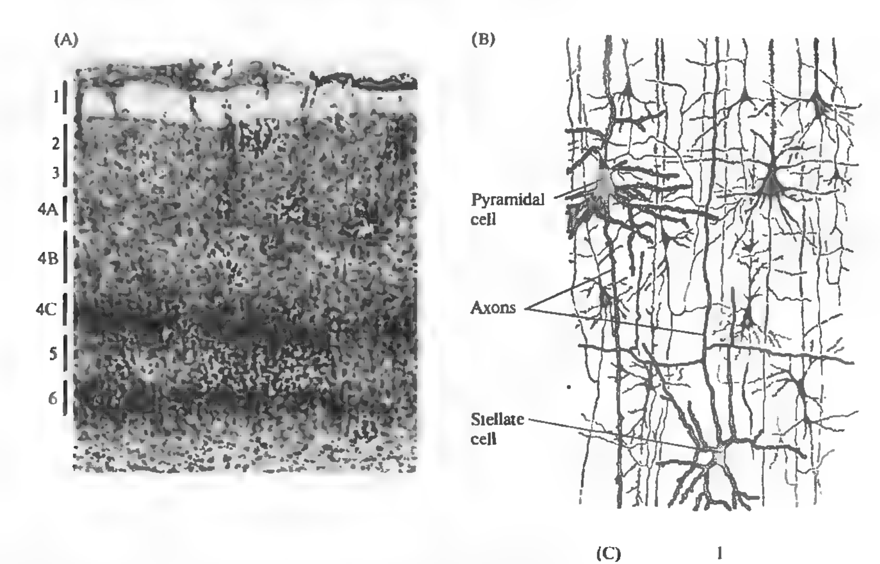
Рис. 20.5. Карта коркового зрительного поля. (А) Зрительное поле разделяется на центральную зону (центральная ямка) и восемь полуквадрантов. Левое зрительное поле проецируется на правую первичную зрительную кору. (В) У человека первичная зрительная кора («зона 17») почти полностью лежит на медиальной поверхности затылочной доли. Представительство центральной ямки расположено сзади, а периферические зоны проецируются спереди. Ямка занимает непропорционально большую долю первичной зрительной коры.

Fig. 20.5. Visual Field Map of the Cortex. (A) The visual field is divided into a central zone (the fovea), and eight hemiquadrants. The left visual field maps onto the right primary visual cortex. (B) In humans, the primary visual cortex (Area 17) lies almost entirely on the medial surface of the occipital lobe. The foveal region is found most posteriorly, with the peripheral zones mapping anteriorly. The fovea claims a disproportionate share of the primary visual cortex.

§ 2. Цитоархитектоника зрительной коры

Зрительная информация поступает в кору и ЛКТ через оптическую радиацию. У обезьян оптическая радиация заканчивается на складчатой пластинке, толщиной около 2 мм (рис. 20.4). Этот регион мозга — известный как первичная зрительная кора, зрительная зона 1 или V_1 — также называется полосатой корой, или «зоной 17». Более старая терминология базировалась на анатомических критериях, разработанных еще в начале XX века. V_1 лежит сзади, в области затылочной доли, и может быть распознана при поперечном разрезе по своему особому внешнему виду. Пучки волокон в этой области формируют полоску, ясно видную невооруженным глазом (поэтому зона и называется «полосатой», рис. 20.4В). Соседние зоны вне зоны полосатости также связаны со зрением. Зона, непосредственно окружающая зону V_1 называется зоной V_2 (или «зона 18») и получает сигналы из зоны V_1 (см. рис. 20.4С). Четкие границы так называемой экстрастриарнои зрительной коры (V_2–V_5) нельзя установить при помощи визуального исследования мозга, хотя для этого разработан ряд критериев[22)–26)]. Например, в V_2 полосатая исчерченность исчезает, большие клетки расположены поверхностно, и грубые, косо расположенные миелиновые волокна видны в более глубоких слоях. Как будет показано в главе 21, различные зрительные зоны производят анализ разного типа.

Каждая зона имеет собственное представление зрительного поля сетчатки, спроецированное строго определенным, ретинотопическим образом. Карты проекций были составлены еще в эпоху, когда не было возможно проводить анализ активности отдельных клеток. Поэтому для картирования использовалось освещение пучками света небольших участков сетчатки и регистрация активности коры при помощи большого электрода. Эти карты, а также их современные аналоги, составленные недавно при помощи методов визуализации головного мозга, таких как позитронно-эмиссионная томография и функциональный ядерно-магнитныи резонанс, показали, что площадь коры, отведенная на представление центральной ямки, гораздо больше по размерам, чем площадь, отведенная на всю остальную сетчатку[27)–30)]. Эти находки, в принципе, соответствовали ожиданиям, поскольку распознавание образов корой осуществляется в основном за счет переработки информации от плотно расположенных в зоне ямки фоторецепторов. Такое представление аналогично расширенному представлению руки и лица в области первичной соматосенсорной коры (глава 18). Ямка сетчатки проецируется в затылочный полюс коры больших полушарий. Карта периферии сетчатки распространяется в переднем направлении вдоль медиальной поверхности затылочной доли (рис. 20.5)[31)]. Из-за перевернутой картины, образуемой на сетчатке при помощи хрусталика, верхнее зрительное поле проецируется на нижнюю область сетчатки и пе-



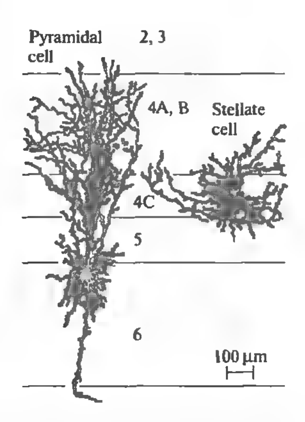


Рис. 20.6. Архитектоника зрительной коры. (A) Четко различима слоистость при срезе через стриарную кору макаки (окраска по Нисслю, выявляющая тела нейронов). Волокна, идущие от ЛКТ, заканчиваются в слоях 4A, 4B и 4C. (B) Рисунок пирамидных и звездчатых клеток в зрительной коре кошки. Отростки, окрашенные по методу Гольджи, расходятся большей частью радиально в толщу коры и проходят лишь на небольшие расстояния в латеральном направлении. (C) Рисунок с фотографии пирамидной клетки и отростчатой звездчатой клетки в коре кошки, инъецированной пероксидазой хрена после регистрации ее активности. Обе клетки являются простыми.

Fig. 20.6. Architecture of Visual Cortex. (A) Distinct layering of cells in a section of striate cortex of the macaque monkey, stained to show cell bodies (Nissl stain). Fibers arriving from the LGN end in layers 4A, 4B, and 4C. (B) Drawing of pyramidal and stellate cells in cat visual cortex. The processes, stained with Golgi technique, for the most part run radially through the thickness of the cortex and extend for relatively short distances laterally. (C) Drawing from photographs of a pyramidal cell and a spiny stellate cell in cat cortex that had been injected with horseradish peroxidase after their activity had been recorded. Both were simple cells. (A from Hubel and Wiesel, 1972; B after Ramón y Cajal 1955; C from Gilbert and Wiesel, 1979.)

редается в область V_1, расположенную ниже шпорной борозды; нижнее зрительное поле проецируется над шпорной бороздой.

На срезах коры нейроны могут быть классифицированы по их форме. Две основные группы нейронов образуют звездчатые и пирамидные клетки. Примеры этих клеток показаны на рис. 20.6B. Основные различия между ними заключаются в длине аксонов и в форме тел клеток. Аксоны пирамидных клеток длиннее, спускаются в белое вещество, покидая кору; отростки же звездчатых клеток заканчиваются в ближайших зонах. Эти две группы клеток могут иметь и другие различия, такие как наличие или отсутствие шипиков на дендритах, которые обеспечивают их функциональные свойства[32]. Есть и другие, причудливо названные нейроны (двухбукетные клетки, клетки-люстры, корзинчатые клетки, клетки-полумесяцы), а также клетки нейроглии. Их характерной особенностью является то, что отростки этих клеток направляются в основном в радиальном направлении: вверх и вниз через толщу коры (под соответствующим углом к поверхности). И наоборот, многие (но не все) их латеральные отростки короткие. Соединения между первичной зрительной корой и корой высшего порядка осуществляется при помощи аксонов, которые проходят в виде пучков через белое вещество, находящееся под клеточными слоями.

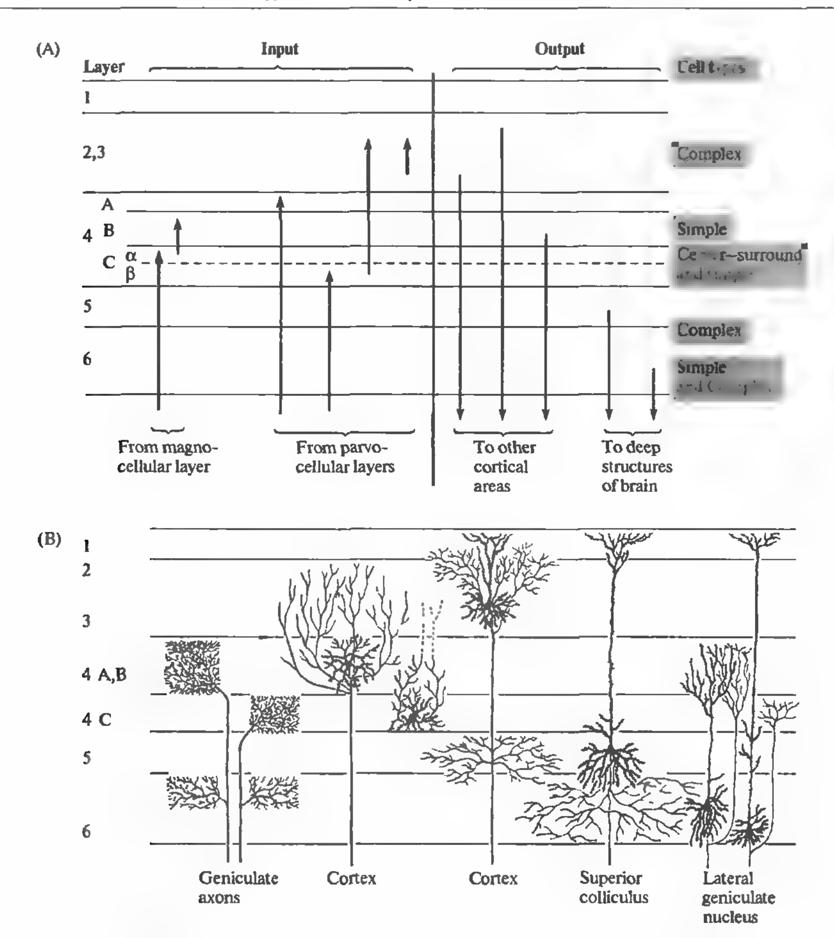


Рис. 20.7. Связи зрительной коры. (A) Слои клеток с различными входящими и исходящими отростками. Отметим, что исходные отростки из ЛКТ в основном прерываются в 4 слое. Отростки из ЛКТ, идущие от крупноклеточных слоев, преимущественно прерываются в 4Cα и 4B слоях, в то время как отростки от мелкоклеточных прерываются в 4A и 4Cβ. Простые клетки расположены в основном в слоях 4 и 6, комплексные клетки — в слоях 2, 3, 5 и 6. Клетки слоев 2, 3 и 4B посылают аксоны в другие корковые зоны; клетки в слоях 5 и 6 посылают аксоны к верхнему холмику и ЛКТ. (B) Типичная ветвистость аксонов ЛКТ и кортикальных нейронов кошки. Кроме подобных вертикальных связей, многие клетки имеют длинные горизонтальные связи, идущие в пределах одного слоя к удаленным регионам коры.

Fig. 20.7. Connections of Visual Cortex. (A) The layers with their various inputs, outputs, and types of cells. Note that inputs from the LGN end mainly in layer 4. Those arising from magnocellular layers end principally in 4Cα and 4B, whereas those from parvocellular layers end in 4A and 4Cβ. Simple cells are found mainly in layers 4 and 6, complex cells in layers 2, 3, 5, and 6. Cells in layers 2,3, and 4B send axons to other cortical areas; cells in layers 5 and 6 send axons to the superior colliculus and the lateral geniculate nucleus. (B) Principal arborizations of geniculate axons and cortical neurons in the cat. In addition to these vertical connections, many cells have long horizontal connections running within a layer to distant regions of the cortex. (A after Hubel, 1988; B after Gilbert and Wiesel, 1981.)

Входящие, исходящие пути и послойная организация коры

Основной особенностью коры млекопитающих является то, что клетки здесь расположены в виде 6 слоев в пределах серого вещества (рис. 20.6A). Слои сильно различаются по внешнему виду, в зависимости от плотности расположения клеток, а также толщины каждой из зон коры. Входящие пути показаны на рис. 20.7A с левой стороны. Исходя из ЛКТ, волокна в основном заканчиваются в слое 4,

с небольшим количеством связей, образуемых также в слое 6. Поверхностные слои получают сигналы из области подушки таламуса (pulvinar zone) или других зон таламуса. Большое количество клеток коры, особенно в области слоя 2, а также в верхних частях слоев 3 и 5 получают сигналы от нейронов, также расположенных в пределах коры. Основная масса волокон, идущих от ЛКТ в слой 4, затем разделяется между различными подслоями, детали строения и функциональное значение которых будет нами рассмотрено в главе 21.

Исходящие из слоев 6, 5, 4, 3 и 2 волокна показаны справа на рис. 20.7A[11, 33]. Клетки, посылающие эфферентные сигналы из коры, могут также управлять внутрикорковыми соединениями между разными слоями. Например, аксоны клетки из слоя 6, кроме ЛКТ, могут также направляться в один из других кортикальных слоев, в зависимости от типа ответа этой клетки[34]. На основании подобного строения зрительных путей можно представить следующий путь зрительного сигнала: информация с сетчатки передается на клетки коры (в основном, в слой 4) аксонами клеток ЛКТ; информация передается из слоя в слой, от нейрона к нейрону по всей толщине коры; переработанная информация пересылается в другие зоны коры при помощи волокон, направляющихся вглубь белого вещества и возвращающихся обратно в область коры. Таким образом, радиальная или вертикальная организация коры дает нам основания полагать, что колонки нейронов работают как отдельные вычислительные единицы, обрабатывая различные детали зрительных сцен и пересылая полученную информацию далее в другие регионы коры.

Разделение входящих волокон от ЛКТ в слое 4

Афферентные волокна ЛКТ заканчиваются в слое 4 первичной зрительной коры, который имеет сложную организацию и может быть исследован как физиологически, так и анатомически. Первой особенностью, которую мы хотим продемонстрировать, является разделение входящих волокон, идущих от разных глаз. У взрослых кошек и обезьян клетки в пределах одного слоя ЛКТ, получая сигналы от одного глаза, посылают отростки к строго определенным скоплениям клеток коры в слое 4C, отвечающим именно за этот глаз. Скопления клеток сгруппированы в виде чередующихся полосок или пучков кортикальных клеток, получающих информацию исключительно от правого или левого глаза. В более поверхностно и глубже расположенных слоях нейроны управляются обоими глазами, хотя обычно с преобладанием одного из них. Хьюбель и Визель провели оригинальную демонстрацию разделения информации от разных глаз и преобладания одного из них в первичной зрительной коре при помощи электрофизиологических методов. Они использовали термин **«глазодоминантные колонки»** (ocular dominance columns) при описании своих наблюдений, придерживаясь концепции кортикальных колонок, разработанной Маунткаслом для соматосенсорной коры (глава 18)[35]. Серия экспериментальных методик была разработана для демонстрации чередующихся групп клеток в слое 4, получающих информацию от правого или левого глаза. Вначале было предложено нанести небольшое повреждение в пределах только одного слоя ЛКТ (напомним, что каждый слой получает информацию только от одного глаза). Если это сделать, то дегенерирующие терминали появляются в слое 4, образуя определенный паттерн чередующихся пятен, которые соответствуют зонам, управляемым глазом, посылающим информацию в поврежденную область ЛКТ. Позднее потрясающая демонстрация существования особого паттерна глазного доминирования была выполнена, используя транспорт радиоактивных аминокислот из одного глаза. Эксперимент состоит в том, что в глаз вводится аминокислота (пролин или лецитин), содержащая атомы радиоактивного трития. Инъекция проводится в стекловидное тело глаза, из которого аминокислота захватывается телами нервных клеток сетчатки и включается в состав белка. Со временем помеченный таким образом белок транспортируется в ганглиозные клетки и по волокнам зрительного нерва в их терминали в пределах ЛКТ. Замечательной особенностью является то, что эта радиоактивная метка также передается от нейрона к нейрону через химические синапсы[36)–38]. В конечном итоге метка попадает в окончания волокон ЛКТ в пределах зрительной коры.

На рис. 20.8 показано расположение в пределах слоя 4 радиоактивных терминалей, образованных аксонами клеток ЛКТ, связанных с глазом, в который вводилась метка (радиоактивность вызывает отложение зерен серебра на фотографической пленке, которую

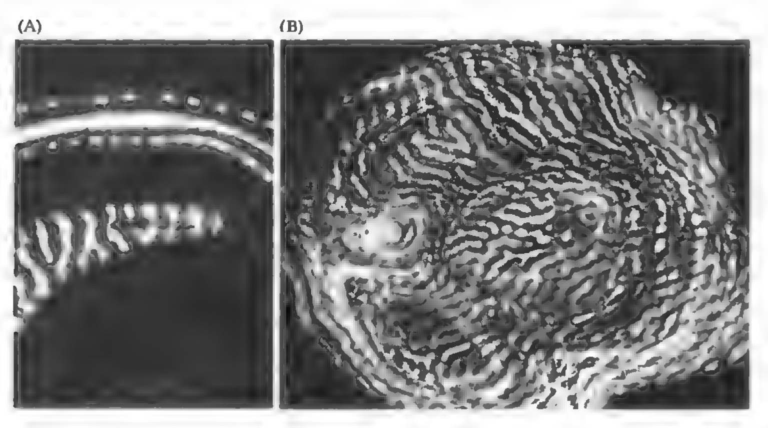


Рис. 20.8. Глазодоминантные колонки в коре обезьяны, полученные при помощи введения радиоактивного пролина в один глаз. Авторадиограммы, снятые при темнопольном освещении, где белым показаны зерна серебра. (A) Сверху рисунка срез проходит через слой 4 зрительной коры под углом к поверхности, образуя перпендикулярный срез колонок. В центре слой 4 был срезан горизонтально, показывая, что колонка состоит из удлиненных пластинок. (B) Реконструкция из множества горизонтальных срезов слоя 4C у другой обезьяны, у которой инъекция проводилась в ипсилатеральный глаз. (Любой горизонтальный разрез может выявить лишь часть слоя 4, что обусловлено кривизной коры.) Как в A, так и в B колонки зрительного доминирования выглядят как полоски равной ширины, получающие информацию либо от одного, либо другого глаза.

Fig. 20.8. Ocular Dominance Columns in monkey cortex demonstrated by injection of radioactive proline into one eye. Autoradiographs photographed with dark-field illumination in which the silver grains appear white. (A) At the top of the picture the section passes through layer 4 of the visual cortex at right angles to the surface, displaying columns cut perpendicularly. In the center, layer 4 has been cut horizontally, showing that the columns consist of longer slabs. (B) Reconstruction made from numerous horizontal sections of layer 4C in another monkey in which the ipsilateral eye had been injected. (No single horizontal section can encompass more than a part of layer 4 because of the curvature of the cortex.) In both A and B, the ocular dominance columns appear as stripes of equal width supplied by one eye or the other. (Autoradiographs kindly provided by S. LeVay.)

располагают непосредственно над зрительной корой, поэтому такие участки выглядят как белые пятна на темном фоне фотографии). Пятна от меток перемежаются с зонами без меток, которые получают информацию от контралатерального глаза, куда не вводилась метка. Расстояние от центра до центра между пятнами, которые соответствуют глазодоминантным колонкам, составляет приблизительно 1 мм.

На клеточном уровне сходная структура была выявлена в слое 4 при помощи введения пероксидазы хрена в отдельные направляющиеся в кору аксоны нейронов ЛКТ[39)–40)]. Аксон, показанный на рис. 20.9, идет от нейрона ЛКТ с "off"-центром, отвечающим короткими сигналами на тени и движущиеся пятна. Аксон заканчивается в двух различных группах отростков в слое 4. Группы меченых отростков отделены пустой немеченной зоной, соответствующей по своим размерам территории, отвечающей за другой глаз. Подобного рода морфологические исследования расширяют границы и позволяют более глубоко понять оригинальное описание колонок глазного доминирования, составленное Хьюбелем и Визелем в 1962 году.

§ 3. Стратегии изучения коры

Проблемой, стоящей перед Хьюбелем и Визелем в 1958 году было то, каким образом сигналы, определяющие маленькие, яркие, темные или цветовые пятна на сетчатке могут быть преобразованы в сигналы, которые несут информацию о форме, размере, цвете, движении и глубине расположения объектов. Методики, считающиеся сейчас рутинными, такие как оптическая регистрация, введение пероксидазы хрена или сканирование мозга, в ту пору даже не могли быть представлены. В начале работы перед Хьюбелем и Визелем стояли совершенно неизученные вопросы, которые исходили из их предположения, что зрительные центры в коре осуществляют переработку информации подобно тому, как это происходит в сетчатке, только на более высоком уровне.

Одной из ключевых стратегий в их анализе было использование стимулов, которые имитировали сигналы, возникающие в нормальных условиях. Например, края, контуры, а также простые паттерны, представленные глазу, позволяли выявлять особенности организации, которые никогда бы не были об-

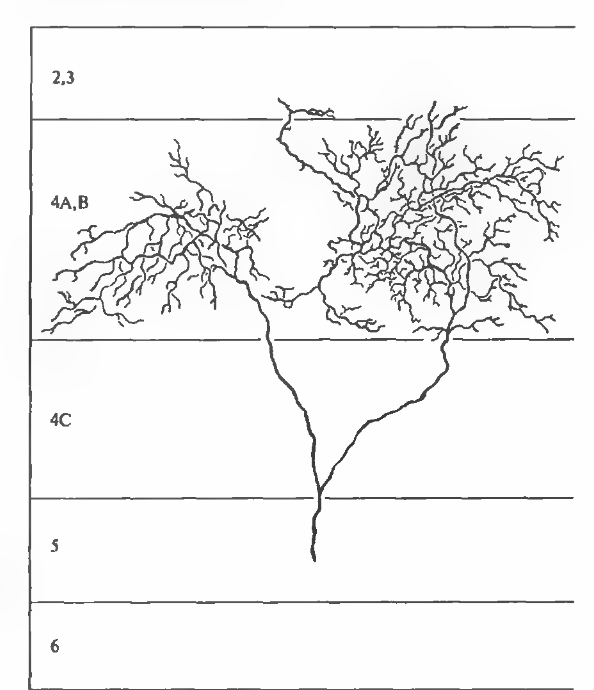


Рис. 20.9. Аксон "off"-центра из ЛКТ, заканчивающийся в слое 4 зрительной коры кошки. В аксон при помощи микроэлектрода была введена пероксидаза хрена. Терминали сгруппированы в два кластера, разделенных неокрашенной зоной, получающей иннервацию от другого глаза.

Fig. 20.9. "Off"-Center Axon from LGN terminating in layer 4 of cat visual cortex. The axon was injected with horseradish peroxidase through a microelectrode. The terminals are grouped in two clusters separated by a vacant zone supplied by the other eye. (After Gilbert and Wiesel, 1979.)

наружены, используя яркие вспышки света, не имеющие какой-либо определенной формы. Другим ключевым моментом успеха подхода Хьюбеля и Визеля было то, что они искали не просто стимул, которые может вызвать ответ определенного нейрона, а наиболее эффективный для этого стимул. Исследование этой проблемы на разных этапах зрительной системы выявило много удивительных и неожиданных результатов. В ранних работах было показано, что рецептивные поля простых и сложных клеток в первичной зрительной коре составляют начальные этапы распознавания паттернов. Кроме того, анализ рецептивных полей четко выявил полезный и упрощающий принцип, что нейроны, расположенные вдоль радиальных трактов, идущих от поверхности коры в белое вещество, решают сходные задачи, формируя функциональные колонки. Эти результаты были окончательно подтверждены при помощи длинного электрода, вводимого далеко вглубь коры, одновременно с чем проводилась регистрация сигналов и идентификация свойств клеток, в зависимости от типа возбуждающего их стимула. После регистрации проводилась тщательная гистологическая реконструкция путей прохождения электрода.

Рецептивные поля коры

Сигналы кортикальных нейронов, подобно сигналам от ганглиозных клеток сетчатки и клеток ЛКТ, в основном появляются на фоне постоянной активности клеток. Наблюдения показывают, что диффузное освещение сетчатки слабо влияет на разряды кортикальных нейронов. Почти полная нечувствительность их к диффузному освещению является результатом процесса, отмеченного еще в сетчатке и в ЛКТ. Это результат в равной степени выраженного антагонистического действия тормозных и возбуждающих регионов рецептивных полей кортикальных клеток. Степень активности нейрона изменяется только при соблюдении определенных условий относительно расположения и формы стимула на сетчатке. Рецептивные поля большинства кортикальных нейронов имеют конфигурацию, отличную от таковой у клеток сетчатки и нейронов ЛКТ, поэтому отдельные пятна света часто являются слабыми стимулами (или вообще ими не являются). В своей нобелевской речи, Хьюбель описал эксперимент, благодаря которому они с Визелем впервые сумели заметить это важнейшее свойство[2]:

Наше первое настоящее открытие случилось совершенно неожиданно. На протяжении двух

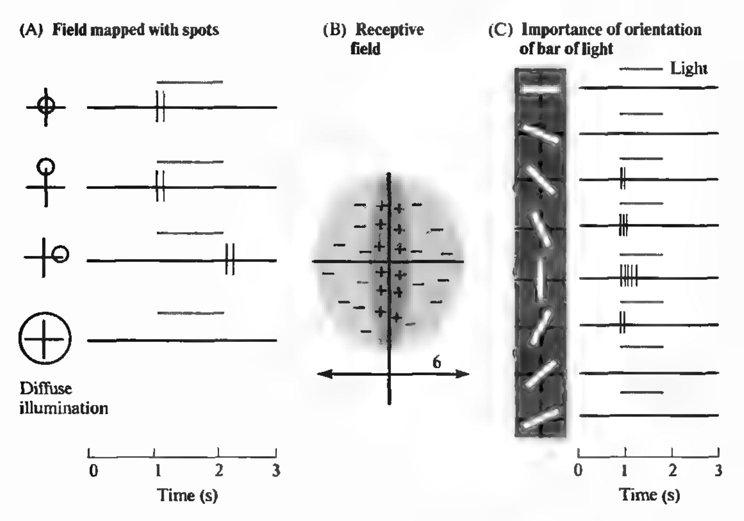


Рис. 20.10. Ответы простых клеток полосатой коры на пятна (А) и полоски (С) света. Рецептивные поля (В) имеют узкую центральную "on"-зону (+), окруженную симметрично антагонистическими "off"-зонами (−). Наилучшим стимулом для данной клетки является вертикально ориентированная полоска света в центре рецептивного поля (пятая запись сверху на С). Другие ориентации менее эффективны или вовсе неэффективны. Рассеянный свет не является каким-либо стимулом. Полоска над каждой записью в А и С указывает продолжительность стимула.

Fig. 20.10. Responses of a Simple Cell in cat striate cortex to spots of light (A) and bars (C). The receptive field (B) has a narrow central "on" area (+) flanked by symmetrical antagonistic "off" areas (−). The best stimulus for this cell is a vertically oriented light bar in the center of its receptive field (fifth record from the top in C). Other orientations are less effective or ineffective. Diffuse light does not stimulate. The bar above each record in A and C indicates the duration of stimulation. (After Hubel and Wiesel, 1959.)

или трех часов у нас ничего не получалось. Затем постепенно мы начали различать какие-то смутные и непостоянные ответы при стимуляции где-то на границе между центром и периферией сетчатки. Мы как раз вставляли слайд на стекле в виде темного пятна в разъем офтальмоскопа, когда внезапно, через аудиомонитор, клетка зарядила как пулемет. Спустя некоторое время, после небольшой паники, мы выяснили, что же случилось. Конечно, сигнал не имел никакого отношения к темному пятну. Во время того, как мы вставляли слайд на стекле, его край отбрасывал на сетчатку слабую, но четкую тень, в виде прямой темной линии на светлом фоне. Это было именно то, чего хотела клетка, и, более того, она хотела, чтобы эта линия имела строго определенную ориентацию. Это было неслыханно. Сейчас даже трудно подумать и представить себе, насколько далеко мы были от какой-либо идеи относительно того, какую роль могут играть клетки коры в обычной жизни животного.

Следуя серии маленьких удачных находок, Хьюбель и Визель нашли наиболее подходящие стимулы света для различных клеток коры; первоначально они классифицировали рецептивные поля на **простые и сложные**. Каждая из этих категорий включала большое количество подгрупп и важных переменных, которые определяли механизмы восприятия.

Ответы простых клеток

Большинство простых клеток расположено в слоях 4 и 6, а также в глубине слоя 3. Все эти слои получают сигналы непосредственно из ЛКТ (хотя именно слой 4С является наиболее типичным местом, куда направляются отростки из ЛКТ, как мы уже ранее указывали). Рецептивные поля простых клеток могут быть определены при помощи пятен света, проецируемых в определенные области сетчатки, и они имеют несколько разновидностей[41, 42]. Один тип простых клеток имеет рецептивное поле, которое состоит из удлиненной узкой центральной части, окруженной двумя антагонистическими зонами. Центр может быть либо возбуждающим, либо ингибирующим. На рис. 20.10 показано рецептивное поле простой клетки в полосатой коре, определенное при помощи пятен света, которые были способны лишь слабо возбудить клетки в центре поля (потому как они покрывали лишь малую часть центральной "on"-зоны).

Необходимые условия для активации одной простой клетки соответствуют тем, что проиллюстрированы на рис. 20.10. Для оптимальной активации ей необходима полоска света, размерами не более центральной зоны, которая полностью ее заполняет по длине и ширине и ориентирована под определенным углом. Освещение окружающей зоны

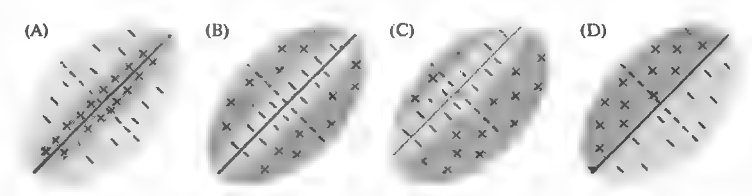


Рис. 20.11. Рецептивное поле простой клетки полосатой коры. В действительности для каждого типа поля были исследованы все возможные ориентации. Наиболее оптимальным стимулом являлось освещение в виде узкой щели или полоски в центре (для A); темная полоска была оптимальной для B и C; граница между темным и светлым — для D. В части случаев регистрировалась значительная асимметрия, как, например, в C.

Fig. 20.11. Receptive Fields of Simple Cells in cat striate cortex. In practice, all possible orientations are observed for each type of field. The optimal stimuli are a narrow slit or bar of light in the center for A; a dark bar for B and C; and an edge with dark on the right for D. Considerable asymmetry can be present, as in C. (After Hubel and Wiesel, 1962.)

подавляет текущую активность клетки, а также уменьшает эффективность одновременного освещения центра зоны. Как было предсказано картированием при помощи световых пятен, вертикально ориентированная полоска является наиболее эффективным стимулом. Даже небольшое отклонение от этого паттерна приводит к уменьшению сигнала. Различные клетки имеют рецептивные поля, требующие широкого диапазона различных ориентаций и расположения. Таким образом, при повороте стимула или при смещении его в пределах зрительного поля, активируется другая популяция простых клеток. Распределение ингибирующих и возбуждающих сторон у различных простых клеток может и не быть симметричным, а также поле может состоять из двух продольных регионов, расположенных друг напротив друга — одного возбуждающего, а другого ингибирующего.

На рис. 20.11 приведены примеры четырех подобных рецептивных полей, имеющих общую ось ориентации, но с различным распределением возбуждающих и угнетающих зон в пределах поля. Максимальный ответ от рецептивного поля, показанного на рис. 20.11A, вызывает узкий щелевидный пучок, ориентированный на 1 час по воображаемому циферблату (при условии, что все рецептивное поле представляет из себя циферблат, разделенный на 12 частей). Темная полоска в том же самом месте с ярким освещением по периферии подавляет постоянную активность клетки. Клетки, имеющие поле, иллюстрированное на рис. 20.11B и C, отвечают на темную полосу в центральной зоне. Для поля, показанного на рис. 20.11D, границы между светом слева и тенью справа является наиболее эффективным "on"-ответом, а освещение, наоборот, оптимально для "off"-разрядов. В простых клетках оптимальная ширина узкого пучка света или полоски тени сравнима с диаметрами регионов с "on"- и "off"-центрами для рецептивных полей в форме бублика у ганглиозных клеток и клеток ЛКТ. Таким образом, кортикальные клетки, которые имеют рецептивные поля в области зрительного пятна, лучше всего возбуждаются узкими полосками света, по сравнению с клетками, имеющими рецептивные поля на периферии сетчатки, что обусловлено более маленькими рецептивными полями ганглиозных клеток ямки.

Также были описаны и другие типы простых клеток. И снова наиболее важными моментами являются ориентация и расположение стимула, так как рецептивное поле состоит из антагонистичных "on"- и "off"-зон. Но кроме того, также важна длина полосы или края: растягивание полоски более оптимальной длины уменьшает эффективность стимула[43]. Это аналогично тому, как если бы существовала дополнительная "off"-зона, расположенная сверху и снизу от полей, показанных на рис. 20.11 и которая стремится к подавлению активности при ее освещении (**торцевое торможение или конечное прерывание** (end-stopping)). Отсюда можно сделать вывод, что для такой простой клетки наиболее оптимальным стимулом является правильно ориентированная полоска или край, которые имеют определенные размеры (и заканчивается в определенном месте поля).

Общими свойствами простых клеток являются то, что: (1) они наилучшим образом отвечают на правильно ориентированные и расположенные стимулы, т. е. которые не вторгаются на антагонистические зоны, и (2) постоянные щелевидные или округлые пятна могут быть использованы для определения "on"- и "off"-зон. Другой постоянной и значимой особенностью является то, что, несмотря на различные соотношения между возбу-

ждающими и ингибирующими зонами, вклады каждой из них абсолютно одинаковы, и одни способны полностью подавить эффекты других, поэтому диффузное освещение всего рецептивного поля дает в лучшем случае слабый ответ. "Off" зоны корковых полей не всегда способны вызвать сигналы в ответ на темные полоски. Часто (в основном в случае конечного ингибирования, а также в хорошо изученных зонах) освещение "off"-зоны может быть обнаружено только по уменьшению сигнала, вызываемого одновременным освещением "on"-зоны. Перемещающиеся края и полоски определенной ориентации очень высоко эффективны в вызывании сигналов. Однако и в данном случае имеется специализация клеток для распознавания различных уровней освещенности, но контрастное представление в виде пятна, свойственное ганглиозной клетке, трансформируется и расширяется в линии или край. При этом пространственное и временное разрешение не теряются, а включаются в более сложный паттерн активности

Синтез простого рецептивного поля

Схема организации поля была предложена ранее Хьюбелем и Визелем для объяснения происхождения корковых рецептивных полей. Схема имела преимущество: она базировалась на известных механизмах для объяснения того, каким образом нервная клетка может настолько избирательно отвечать на зрительные паттерны — такие как определенным образом ориентированные линии, которые возбуждают простые клетки. Они предположили, что в коре простые клетки ведут себя, как если бы они были составлены из большого количества рецептивных полей ЛКТ. Эта идея проиллюстрирована на рис. 20.12А, где поля нейронов ЛКТ, соединенные с клеткой коры, выровнены таким образом, что определенным способом ориентированная полоска света, проходящая через центр, вызвала бы их значительное возбуждение. Если бы полоска была чуть шире, или расположена чуть в стороне, она бы попала в область угнетающего фона каждой клетки, что привело бы к снижению или полному исчезновению возбуждающего сигнала. Конвергенция сигнала от нейронов ЛКТ, имеющих свои рецептивные поля определенной формы, способствует формированию на кортикальной клетке «большого» рецептивного поля, наиболее чувствительного как раз к подобным образом ориентированной полоске света.

Связи между клетками, которые были постулированы Хьюбелем и Визелем, являются простейшими в своем роде, способными объяснить избирательность поля к ориентации полоски света. Таким образом, паттерны связей между нейронами ЛКТ и коры сами по себе определяют физиологические свойства кортикальных нейронов. Простые рецептивные поля усложняются при помощи большого количества интернейронов, которые формируют сложную внутреннюю структуру связей. Ферстер сумел экспериментально показать, каким образом рецептивные поля простых клеток синтезируются в коре кошки при помощи внутриклеточной регистрации сигналов от нейронов слоя 4 зрительной коры кошки[44)]. В подобного рода исследованиях можно следить за синаптическими потенциалами, вызываемыми зрительными стимулами. Считается, что большинство синаптических сигналов происходит благодаря высвобождению медиатора из афферентных волокон нейронов ЛКТ. При этом происходит суммация их эффектов, что в результате выражается в более высокой амплитуде сигнала при определенной «предпочтительной» ориентации, чем это можно было бы ожидать на основании той схемы, что показана на рис. 20.12А.

Еще более тщательный тест был проведен при охлаждении коры, подавляя таким образом полисинаптическую активность[45)]. При этих условиях остается только прямой моносинаптический сигнал от ЛКТ (хотя и более медленный и меньше по амплитуде) (рис. 20.12В), однако ориентационная чувствительность при этом сохраняется (рис. 20.12С). Хотя паттерн входящих сигналов от ЛКТ и достаточен для создания определенной ориентационной чувствительности простых клеток, дополнительная «настройка» осуществляется при помощи тормозных[46, 47)] и возбуждающих[48)] внутрикорковых связей. Внутриклеточная регистрация на простых клетках показала, что освещение окружающих "off"-зон вызывает тормозные синаптические потенциалы[49, 50)], которые служат для придания большей резкости ориентационной избирательности и способствуют более тонкой настройке при изменении контраста[51)].

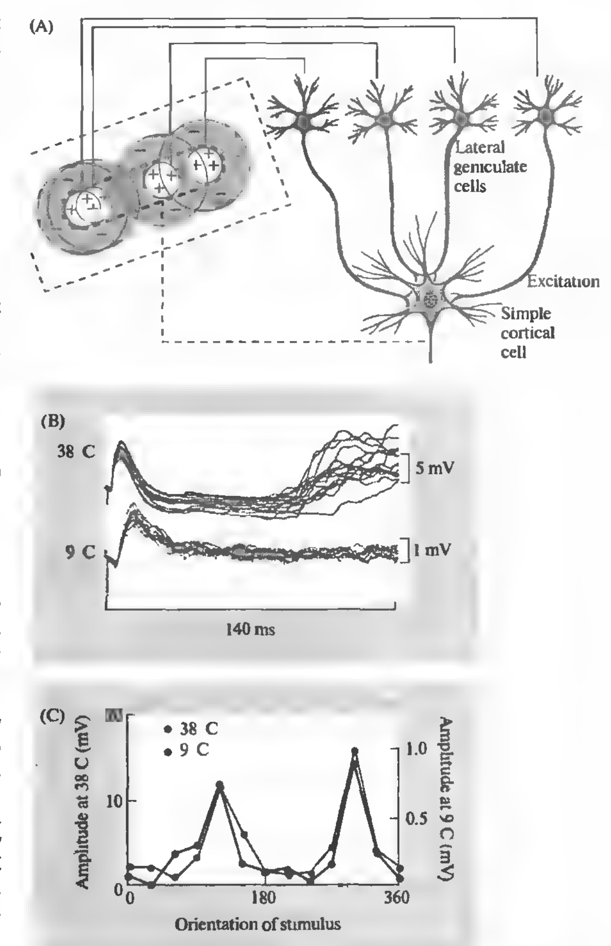


Рис. 20.12. Синтез простых рецептивных полей. Хьюбелем и Визелем была выдвинута гипотеза для объяснения синтеза рецептивных полей простых клеток. (A) Удлиненное рецептивное поле простой клетки формируется при конвергенции исходных сигналов от множества нейронов ЛКТ (на рисунке показано только 4), концентрические рецептивные поля которых находятся на сетчатке параллельно. (B) Ответы простых клеток при охлаждении коры. Электрическая стимуляция ЛКТ вызывает короткую (моносинаптическую) задержку синаптических потенциалов при 38° C в простой клетке. Потенциалы становятся меньше по амплитуде и частоте при температуре 9° C. Отмечено, что охлаждение полностью устраняет сигналы с большой (полисинаптической) задержкой. (C) Ориентационная «подстройка» к зрительным стимулам в сравнении при обеих температурах соответствует гипотезе о том, что исходные сигналы из ЛКТ определяют поля рецептивной клетки и не нуждаются в интракортикальной обратной связи.

Fig. 20.12. Synthesis of Simple Receptive Fields. Hypothesis devised by Hubel and Wiesel to explain the synthesis of simple-cell receptive fields. (A) The elongated receptive field of a simple cell is produced by the convergence of inputs from many geniculate neurons (only four are shown) whose concentric receptive fields are aligned on the retina. (B) Effect of cortical cooling on the response of simple cells. Electrical stimulation of the LGN causes short latency (monosynaptic) synaptic potentials at 38° C in a simple cell. These become smaller and slower at 9° C. Note that cooling eliminates longer-latency (polysynaptic) signals. (C) Orientation tuning to visual stimuli is comparable at both temperatures, consistent with the hypothesis that geniculate input specifies the simple-cell receptive field and does not require intracortical feedback. (A after Hubel and Wiesel, 1962; B and C after Ferster, Chung, and Wheat, 1996.)

Ответы сложных клеток

При отведении сигналов от отдельных нейронов зрительной коры кроме простых клеток также можно обнаружить и клетки, которые отличаются по своему поведению. Эти сложные клетки, которые преобладают в слоях 2, 3 и 5, имеют два важных свойства, общих с простыми клетками: освещение всего их рецептивного поля неэффективно, и им необходима определенная ориентация границы света и тени в пределах поля[52]. Однако они не так критичны к точному расположению стимула, как простые клетки. Более того, у них также нет четких “on”- и “off”-зон, которые можно определить с помощью световых пятен. Большинство сложных клеток отвечает импульсацией на протяжении всего времени, пока определенным образом ориентированный пучок света падает в пределах границ рецептивного поля, как показано в примере на рис. 20.13. Значение же сигнала, поступающего от сложных клеток, значительно отличается от сигналов от простых клеток. Простая клетка локализует определенным образом ориентированную полосу света, расположенную в определенной области рецептивного поля; сложная клетка посылает сигналы в ответ на определенную ориента-

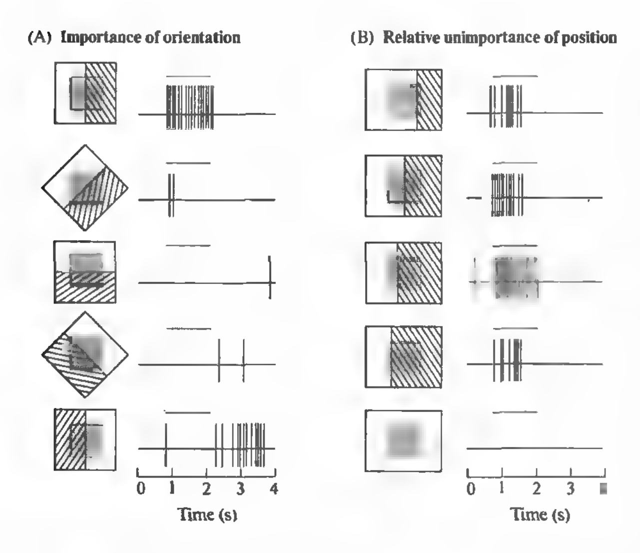


Рис. 20.13. Ответы сложных клеток в полосатой коре кошки. Клетка реагирует наилучшим образом на вертикальную границу, проходящую через ее рецептивное поле (серый квадрат в центре). (А) При освещении левой половины и затемнении (заштриховано) справа (первая запись) возникает "on"-ответ. При освещении справа (пятая запись) возникает "off"-ответ. Любая ориентация освещения, отличная от вертикальной, менее эффективна. (В) Расположение границы света в пределах поля не играет существенной роли. Освещение всего рецептивного поля (самая нижняя запись) не вызывает никакого ответа.

Fig. 20.13. Responses of a Complex Cell in cat striate cortex. The cell responds best to a vertical edge located within its receptive field (the grey square). (A) With light on the left and dark (hatching) on the right (first record), there is an "on" response. With light on the right (fifth record), there is an "off" response. Orientation other than vertical is less effective. (B) The position of the border within the field is not important. Illumination of the entire receptive field (bottom record) gives no response. (After Hubel and Wiesel, 1962.)

цию, абстрагируясь от четкой локализации стимула в пределах рецептивного поля.

Можно различить два основных класса сложных клеток, причем оба они наилучшим образом реагируют на перемещение краев или узких полосок света фиксированной ширины и определенной ориентации. Один тип клеток отвечает сигналами, показанными на рис. 20.13. Сигналы возникают в ответ на границу света определенной ориентации в любом месте в пределах ограниченной области. В этом примере вертикальная граница света вызывает практически одинаковые по амплитуде сигналы в любой из четырех локализаций, как показано на рис. 20.13В. Другие ориентации границы являются неэффективными. Для клеток этого типа ответы становятся более стабильными и высокоамплитудными при удлинении размеров границы или узкого пучка до определенного предела, после которого параметры сигналов уже не меняются.

Другие сложные клетки, подобно конечно-прерывистым простым клеткам (end-stopped simple cells), требуют узких пучков или краев, которые кончаются в пределах их рецептивного поля[3, 53]. Наилучшим стимулом для таких клеток, следовательно, будет не только определенная ориентация, но и какая-то прерывистость, такая как прерывание линии, внутренний или наружный угол (angle and corner) какого-либо контура. На рис. 20.15 показаны ответы клетки подобного типа, которая отвечает максимально на границу под углом 45°, когда освещенная область находится сверху, а затененная — снизу.

Рассеянное освещение, другая ось ориентации света или отдельные пятна света никак не влияют на активность этой клетки. На первый взгляд, сложная клетка на рис. 20.13 может быть отнесена к тому же типу, что и показанная на рис. 20.14. Различие, однако, становится очевидным на четвертом и пятом сигнале сверху, показанном на рис. 20.14, когда продолжается граница темного поля: удлинение границы вправо вызывает уменьшение сигнала. Однако диффузное освещение правого поля не дает ослабление сигнала (последний сигнал на рисунке). Таким образом, это нельзя назвать "off"-зоной. Оптимальным стимулом для этой зоны является наружный угол. Более того, стимул должен перемещаться в определенную сторону. Такая чувствительность к направлению перемещения — свойство, как правило, присущее сложным клеткам. Однако можно найти и более требовательные сложные клетки, особенно в пределах экстрастриарной коры[3].

Синтез сложного рецептивного поля

Таким же образом, как рецептивное поле простой клетки может быть построено как кон-

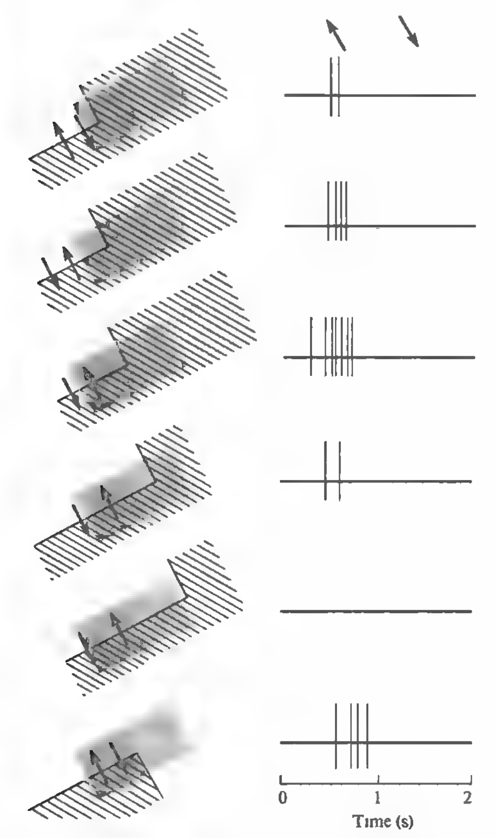


Рис. 20.14. Торцевое торможение комплексной клетки в зоне V_2 («зона 18») в коре кошки. Лучшим стимулом для этой клетки (третья запись сверху) является движение (показано стрелками) и определенным образом ориентированная граница (угол), которая не вторгается на антагонистическую правую зону рецептивного поля. Записи показывают также избирательную чувствительность клетки к движениям вверх-вниз

Fig. 20.14. End Inhibition of a Complex Cell in V_2 (area 18) of the cat cortex. The best stimulus for this cell (third record from the top) is a moving (arrows), oriented edge (a corner) that does not encroach on the antagonistic right-hand portion of the receptive field. The records also show the selective sensitivity of the cell to upward movement. (After Hubel and Wiesel 1965.)

вергенция афферентов из ЛКТ, также и рецептивное поле сложной клетки может быть составлено из комбинации полей простых клеток. На рис. 20.15 представлена гипотетическая сложная клетка, которая возбуждается стимулом в виде вертикальной границы, расположенной в любом месте в пределах рецептивного поля. Так происходит из-за того, что где бы ни находилась граница света и тени, одно из полей простых клеток обязательно окажется пересеченным по своей вертикальной угнетающей/возбуждающей границе. Другие простые клетки не отреагируют на этот сигнал, так как их зоны либо одинаково освещены, либо одинаково затемнены. Диффузное освещение всего поля покрывает все компоненты поля в равной степени, а потому ни одна клетка не срабатывает.

Существует предположение, что активности только одной или нескольких простых клеток достаточно для того, чтобы вызвать ответ максимальной амплитуды на сложной клетке. Согласуясь с этой гипотезой, при внутриклеточной регистрации сигналов сложных клеток было выявлено несколько моносинаптических контактов с клетками ЛКТ, хотя большинство контактов было образовано двухсинаптическими афферентными волокнами с большой задержкой, которые предположительно идут от простых кортикальных клеток[46]. Конечно-прерывистая сложная клетка показана на рис. 20.15B. На рисунке показаны две сложные клетки с противоположными синаптическими эффектами, которые комбинируются, чтобы образовать конечно-прерывистую клетку, способную распознать угол.

Рецептивные поля: единицы восприятия формы

Все полученные результаты говорят в поддержку идеи иерархической организации, когда усложнение организации рецептивного поля происходит вследствие конвергенции исходных сигналов на новом уровне. Это не означает, что каждое последующее рецептивное поле, более сложное по организации, образовано только комбинацией информации, полученной на предыдущем уровне. Например, сложные клетки коры могут получать информацию непосредственно от клеток ЛКТ[13]. Кроме того, в коре имеется обратная связь между различными уровнями организации, а также в пределах одного уровня[54]. Как уже упоминалось ранее, корковые афференты служат для более точной ориентационной настройки простых клеток. Тем не менее, оригинальная рабочая гипотеза, предложенная Хьюбелем и Визелем в 1962 году, дает ясную, элегантную и обоснованную концептуальную основу, актуальную до настоящего

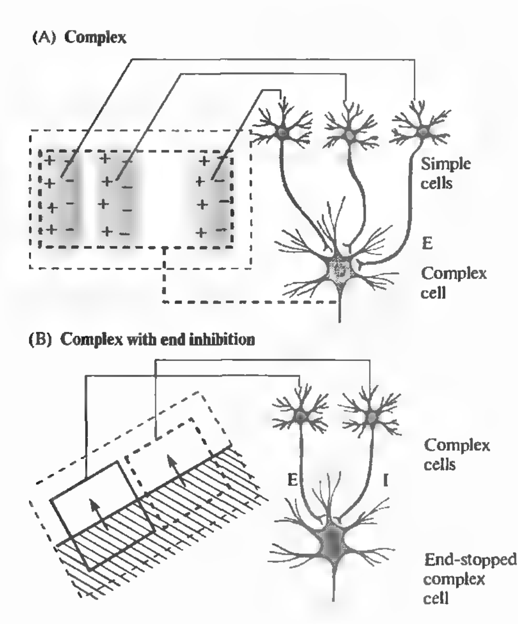


Рис. 20.15. Синтез сложных рецептивных полей. (A) Конвергирующие входящие сигналы от простых клеток, отвечающих наилучшим образом на вертикально-ориентированные границы света, расположенные по-разному, могут в результате имитировать поведение сложных клеток, которые хорошо отвечают на вертикально-ориентированные границы, расположенные где угодно в пределах их рецептивных полей. (B) Каждая из двух рецептивных клеток отвечает лучшим образом на косо-ориентированную границу. Но одна из этих клеток возбуждающая, а другая — ингибирующая по отношению к конечно-прерывистой комплексной клетке. Таким образом, граница, которая покрывает оба рецептивных поля, как показано на схеме, является неэффективной, в то время как угол, покрывающий только левое поле, вызывает возбуждающий сигнал. E — возбуждение, I — ингибирование.

Fig. 20.15. Synthesis of Complex Receptive Fields. (A) Convergent input from simple cells responding best to a vertically oriented edge at slightly different positions could bring about the behavior of a complex cell that responds well to a vertically oriented edge situated anywhere within its field. (B) Each of two complex cells responds best to an obliquely oriented edge. But one cell is excitatory and the other is inhibitory to the end-stopped complex cell. Hence, an edge that covers both fields, as in the sketch, is ineffective, whereas a corner restricted to the left field would excite E = excitation; I = inhibition. (After Hubel and Wiesel, 1962, 1965.)

времени, позволяющую планировать новые экспериментальные подходы.

В табл. 20.1 представлены некоторые характеристики рецептивных полей на различных уровнях зрительной системы. Каждый глаз доставляет в мозг информацию от регионов сетчатки различного размера. Особое внимание глаз уделяет не диффузному освещению или абсолютному значению энергии, поглощенной фоторецепторами. Наоборот, зрительная система старается выделить информацию о контрастности, сравнивая уровни активности клеток соседних рецептивных полей. На каждом более высоком уровне подобного рода нейронные расчеты приводят к более сложно организованным пространственным феноменам.

Весь этот труд может быть оценен, принимая во внимание типы сигналов, генерируемых квадратным пятном света, как показано на рис. 20.16. Ганглиозная клетка сетчатки с "on"-центром, расположенная в пределах этого квадрата, повысит свою активность (по крайней мере, в начале), в то время как активность клетки с "off"-центром будет подавлена. Однако наилучшим образом будут стимулированы те ганглиозные клетки, изображение на которых обладает максимальным контрастом — т. е. центры которых находятся в непосредственной близости к границе между светлыми и темными зонами и, следовательно, имеющие минимум активных ингибирующих зон. Нейроны в ЛКТ ведут себя сходным образом. Кортикальные клетки имеют рецептивные поля, лежащие или полностью в пределах квадрата, или за его пределами, не посылая никаких сигналов в ответ на диффузное освещение, которое не является для них эффективным стимулом. Только те простые клетки, рецептивные поля которых ориентированы на совпадения вертикальной и горизонтальной границ квадрата, могут быть им стимулированы.

Подобные же рассуждения можно применить к стимуляции сложных клеток, которые также требуют определенным образом ориентированных полосок света или границ. Конечно-прерывистая сложная клетка способна обнаружить угол квадрата или окончание линии. Это является важным отличием, особенно с учетом того факта, что глаз постоянно совершает небольшие саккадические движения. Эти перемещения глаз не воспринимаются нами как движение объектов в поле зрения, однако они очень важны для предупреждения адаптации фоторецепторов, которое

Таблица 20.1. Характеристики рецептивных полей на последовательных уровнях обработки информации в зрительной системе.

Table 20.1. Characteristics of receptive fields at successive levels of the visual system.

Type of cell	Shape of field	What is best stimulus?	How good is diffuse light as a stimulus?	Is orientation of stimulus important?	Are there distinct "on" and "off" areas within receptor fields?	Are cells driven by both eyes?	Can cells respond selectively to movement in one direction?
Photoreceptor	⊕	Light	Good	No	No	No	No
Ganglion	– ⊕ –	Small spot or narrow bar over center	Moderate	No	Yes	No	No
Geniculate	– ⊕ –	Small spot or narrow bar over center	Poor	No	Yes	No	No
Simple (layers 4 and 6 only)	/ × /	Narrow bar or edge (some end-inhibited)	Ineffective	Yes	Yes	Yes (except in layer 4)	Some can
Complex (outside layer 4)	↑	Bar or edge	Ineffective	Yes	No	Yes	Some can
End-inhibited complex (outside layer 4)	↑	Line or edge that stops; corner or angle	Ineffective	Yes	No	Yes	Some can

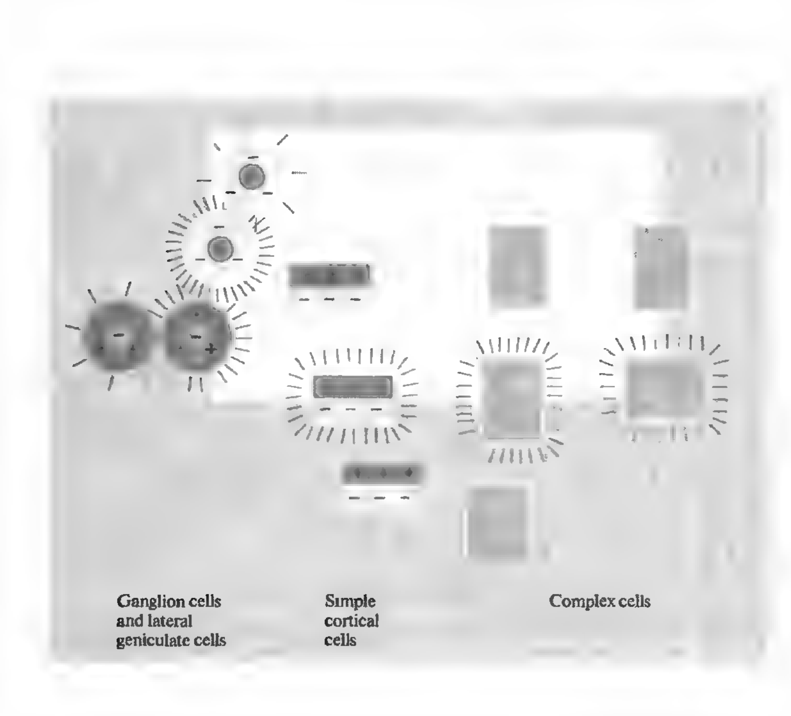


Рис. 20.16. Ответы нейронов на зрительный паттерн. При действии на сетчатку квадратного пучка света сигналы возникают в основном в тех ганглиозных клетках и в клетках ЛКТ, рецептивные поля которых расположены вблизи границ квадрата, а не в тех, рецептивные поля которых подвергаются монотонному освещению или находятся в тени. Активируются также простые и комплексные клетки, имеющие рецептивные поля в нужных местах (расположенные вдоль границы или угла) и правильную чувствительность к ориентации. Те же клетки, которые расположены не на границе или имеют другую ориентацию, останутся неактивными. Уровень активности указывается числом расходящихся линий вокруг каждого поля.

Fig. 20.16. Responses of Neurons to a Pattern. When a square patch of light is presented to the retina, signals arise predominately from ganglion cells and lateral geniculate cells whose receptive fields lie close to the border of the square, not those subjected to uniform light or darkness. Simple and complex cells having receptive fields with the correct position (situated along the border or at a corner) and the correct orientation preference will also fire; those not on the border or with an inappropriate orientation will remain silent. Activity level is indicated by the number of radiating lines around each field.

происходило бы, если бы глаз был неподвижен. Каждое микродвижение (“microsaccade”) приводит к активации новой популяции простых клеток, имеющих абсолютно ту же ориентацию, однако рецептивные поля которых немного смещены друг относительно друга. Для сложных же клеток, которые способны «видеть» квадрат, граница, определенным образом ориентированная, может проходить где угодно в пределах поля. Таким образом, большинство сложных клеток не изменят своей активности при движениях глаза до тех пор, пока перемещения глаза малы и паттерн не выходит за пределы их рецептивных полей.

Если все предыдущие выкладки верны, можно прийти к неожиданному выводу, что первичная зрительная кора получает очень мало информации об абсолютном уровне однотонного освещения в пределах пятна квадратной формы. Сигналы поступают только от клеток, рецептивные поля которых расположены близко к границе объекта. Гипотезу также подтверждают легко воспроизводимые психофизические эксперименты. Светлый квадрат, окруженный темным бордюром, будет казаться нам более темным при увеличении яркости фона. Другими словами, мы воспринимаем разницу или контраст на границе, и только таким образом мы можем оценить яркость однотонно освещенной зоны. Однако это не говорит о том, что общая освещенность совсем не берется в расчет нервной системой. Например, зрачок изменяет свои размеры в зависимости от интенсивности проходящего света в больших пределах. Регулирование размеров зрачка происходит по механизму обратной связи, которая осуществляется в том числе и при помощи зрительного нерва (который посылает эту информацию в ЦНС).

Работы Хьюбеля, Визеля и многих других сделали очевидным тот факт, что первым

общим шагом в анализе зрительной информации является распознавание линии и краев при помощи рецептивных округлых полей сетчатки и принципа «центр-фон». На уровне V_1 зрительная система начинает анализировать форму предмета на основе карты сетчатки. Обнаружение этих связей дало нам возможность немного понять то, каким же образом «работает» головной мозг. Но эти первые шаги по распознаванию линии или даже угла остаются еще очень далеки от полного зрительного распознавания, когда, комбинируя форму, цвет, размер и движения предмета, мы может определить, что это: корова, машина или лицо друга. В главе 21 мы опишем параллельные пути в коре, которые могут обеспечивать эти субмодальности зрения.

Выводы

- Латеральное коленчатое тело таламуса получает сигналы от ганглиозных клеток сетчатки. Сигналы от обоих глаз направляются в различные слои.
- Слои латерального коленчатого тела функционально различны. Имеется три основных типы ответов клеток: крупноклеточные (magnocellular), мелкоклеточные (parvocellular) или кониоклеточные (koniocellular).
- Шесть слоев первичной зрительной коры служат исходными и дальнейщими этапами анализа сигнала в коре.
- Афферентные сигналы от обоих глаз разделяются в слое 4С стриарной коры, образуя колонки зрительного доминирования, которые можно определить либо физиологически, либо анатомически.
- Крупноклеточные и мелкоклеточные слои ЛКТ проецируются различным образом в разные подслои коркового слоя 4С.
- Рецептивное поле одной клетки ЛКТ имеет концентрическую («центр-фон») организацию, повторяя строение поля ганглиозной клетки сетчатки и слабо отвечая на однотонное освещение.
- Простые клетки полосатой зрительной коры отвечают на определенным образом ориентированные полоски света или тени. Рецептивные поля здесь могут быть «размечены» при помощи пятен света, они образованы как бы несколькими примыкающими друг к другу с боков рецептивными полями ЛКТ.
- Сложные клетки полосатой коры также отвечают на ориентированные световые полоски и границы. Однако их рецептивные поля не могут быть отмечены при помощи пятен света, поскольку результат является конвергенцией множества сигналов простых клеток, рецептивные поля которых примыкают друг к другу.
- Торцевое торможение появляется тогда, когда имеется дополнительная угнетающая зона, определяющая оптимальную длину стимула для простой или сложной клетки.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Callaway, E. M. 1998. Local circuits in primary visual cortex of the macaque monkey. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 47–74.
- Ferster, D., and Miller, K. D. 2000. Neural mechanisms of orientation selectivity in the visual cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 23: 441–471.
- Gilbert, C. D. 1983. Microcircuitry of the visual cortex. *Annu. Rev. Neuroscl.* 6: 217–247.
- Hendry, S. H. C., and Calkins, D. J. 1998. Neuronal chemistry and functional organization in the primate visual system. *Trends Neurosci.* 21: 344–349.
- Hubel, D. H. 1988. *Eye, Brain and Vision.* Scientific American Library. New York.

Статьи

- Ferster, D., Chung, S., and Wheat, H. 1996. Orientation selectivity of thalamic input to simple cells of cat visual cortex. *Nature* 380: 249–252.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1959. Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J. Physiol.* 148: 574–591.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1961. Integrative action in the cat's lateral geniculate body. *J. Physiol.* 155: 385–398.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol.* 160: 106–154.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1965. Receptive fields and functional architecture in two non-striate visual areas (18 and 19) of the cat. *J. Neurophysiol.* 28: 229–289.

- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1968. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J. Physiol.* 195: 215–243.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1972. Laminar and columnar distribution of geniculo-cortical fibers in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 146: 421–450.
- Kuffler, S. W. 1953. Discharge patterns and functional organization of the mammalian retina. *J. Neurophysiol.* 16: 37–68.
- Van Essen, D. C., and Drury, H. A. 1997. Structural and functional analyses of human cerebral cortex using a surface-based atlas. *J. Neurosci.* 17: 7079–7102.

Цитированная литература

1. Kuffler, S. W. 1953. *J. Neurophysiol.* 16: 37–68.
2. Hubel, D. H. 1982. *Nature* 299: 515–524.
3. Guillery, R. W. 1970. *J. Comp. Neurol.* 138: 339–368.
4. Hendry, S. H. C., and Yoshioka, T. 1994. *Science* 264: 575–577.
5. Casagrande, V. A. 1994. *Trends Neurosci.* 17: 305–310.
6. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1972. *J. Comp. Neurol.* 146: 421–450.
7. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1961. *J. Physiol.* 155: 385–398.
8. Bowling, D. B., and Michael, C. R. 1980. *Nature* 286: 899–902.
9. Chen, W., et al. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2430–2434.
10. Azzopardi, P., Jones, K. E., and Cowey, A. 1999. *Vision Res.* 39: 2179–2189.
11. Gilbert, C. D. 1983. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 217–247.
12. Sillito, A. M., et al. 1994. *Nature* 369: 479–482.
13. Funke, K., and Worgotter, F. 1997. *Prog. Neurobiol.* 53: 67–119.
14. Weliky, M., and Katz, L. C. 1999. *Science* 285: 599–604.
15. White, A. J., et al. 1998. *J. Neurophysiol.* 80: 2063–2076.
16. Dacey, D. M., and Lee, B. B. 1994. *Nature* 367: 731–735.
17. Martin, P. R., et al. 1997. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1536–1541.
18. Take, A. K., and Malpeli, J. G. 1998. *J. Neurophysiol.* 80: 2206–2209.
19. LeVay, S., and McConnell, S. K. 1982. *Nature* 300: 350–351.
20. Stryker, M. P., and Zahs, K. R. 1983. *J. Neurosci.* 10: 1943–1951.
21. Schiller, P. H., and Malpeli, J. G. 1978. *J. Neurophysiol.* 41: 788–797.
22. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1965. *J. Neurophysiol.* 28: 229–289.
23. Shipp, S., and Zeki, S. 1985. *Nature* 315: 322–325.
24. DeYoe, E. A., et al. 1990. *Vis. Neurosci.* 5: 67–81.
25. Maunsell, J. H., and Newsome, W. T. 1987. *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 363–401.
26. Kaas, J. H. 1996. *Prog. Brain Res.* 112: 213–221.
27. Talbot, S. A., and Marshall, W. H. 1941. *Am J. Ophthalmol.* 24: 1255–1264.
28. Daniel, P. M., and Whitteridge, D. 1961. *J. Physiol.* 159: 203–221.
29. Fox, P. T., et al. 1987. *J. Neurosci.* 7: 913–922.
30. Engel, S. A., Glover, G. H., and Wandell, B. A. 1997. *Cerebral Cortex* 7: 181–192.
31. Van Essen, D. C., and Drury, H. A. 1997. *J. Neurosci.* 17: 7079–7102.
32. Lund, J. S. 1988. *Annu. Rev. Neurosci.* 11: 253–288.
33. Callaway, E. M. 1998. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 47–74.
34. Hirsch, J. A., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 8086–8094.
35. Mountcastle, V. B. 1957. *J. Neurophysiol.* 20: 408–434.
36. Specht, S., and Grafstein, B. 1973. *Exp. Neurol.* 41: 705–722.
37. LeVay, S., Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1975. *J. Comp. Neurol.* 159: 559–576.
38. LeVay, S., et al. 1985. *J. Neurosci.* 5: 486–501.
39. Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. 1979. *Nature* 280: 120–125.
40. Blasdel, G. G., and Lund, J. S. 1983. *J. Neurosci.* 3: 1389–1413.
41. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1959. *J. Physiol.* 148: 574–591.
42. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1968. *J. Physiol.* 195: 215–243.
43. Gilbert, C. D. 1977. *J. Physiol.* 268: 391–421.
44. Ferster, D. 1988. *J. Neurosci.* 8: 1172–1180.
45. Ferster, D., Chung, S., and Wheat, H. 1996. *Nature* 380: 249–252.
46. Sillito, A. M. 1979. *J. Physiol.* 289: 33–53.
47. Sato, H., et al. 1996. *J. Physiol.* 494: 757–771.
48. Stratford, K. J., et al. 1996. *Nature* 382: 258–261.
49. Pei, X., et al. 1994. *J. Neurosci.* 14: 7130–7140.
50. Hirsch, J. A., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 9517–9528.
51. Sompolinsky, H., and Shapley, R. 1997. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 514–522.
52. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1962. *J. Physiol.* 160: 106–154.
53. Palmer, L. A., and Rosenquist, A. C. 1974. *Brain Res.* 67: 27–42.
54. Lamme, V. A. F., Super, H., and Spekreijse, H. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 529–535.

Глава 21

Функциональная архитектура зрительной коры

Зрительная кора организована в виде вертикальных кластеров клеток, имеющих сходные функциональные свойства. Нейроны, получающие информацию избирательно либо от правого, либо от левого глаза, сгруппированы в глазодоминантные колонки. Ориентационные колонки состоят из нейронов, которые имеют сходную чувствительность к углам ориентации линий и краев изображения. Глазодоминантные колонки и ориентационные колонки были впервые открыты при регистрации электрической активности от группы кортикальных клеток во время прохождения электродом вглубь зрительной коры. Глазодоминантные и ориентационные колонки могут быть также визуализованы при помощи биохимических и оптических методов, которые выявляют зоны активности коры у живого животного.

Аксоны крупноклеточных (magnocellular, M) и мелкоклеточных (parvocellular, P) нейронов ядер латерального коленчатого тела проецируются в различные области 4 слоя первичной зрительной коры. В дальнейшем эта информация по M- или P-трактам распространяется в различающиеся области первичной и вторичной зрительной коры. Нейроны M-пути отвечают за детекцию движущихся стимулов. Они также чувствительны к различиям в контрастности и интенсивности зрительных стимулов. Нейроны P-пути ответственны за тонкие детали изображения и восприятие цвета.

При восприятии изображения такие его элементы, как цвет и движение, анализируются независимо. Это иллюстрируется тем фактом, что повреждения в изолированных зонах мозга приводят к селективной потере одного из этих свойств, но не сказываются на общем восприятии изображения глазом. Повреждения в области париетальной коры, известной как MT (или V_5), приводят к полной потере способности определять движения объектов и к нарушениям в восприятии интенсивности изображения. При локализации повреждения в затылочно-височной области (зона V_4) теряется способность к распознаванию цвета.

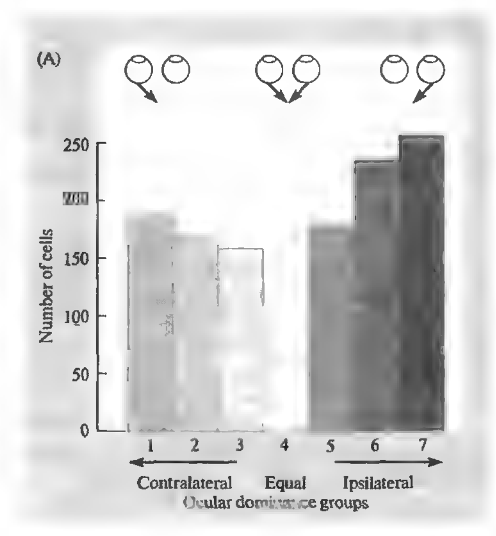
Выдающимся достижением является использование неинвазивных методов функционального магнитного резонанса для определения зон активности мозга животных и человека. Хотя отдельные корковые глазодоминантные и ориентационные колонки имеют размеры меньше сегодняшнего предела разрешения данного метода, именно при помощи этого метода были найдены области зрительной коры, специализирующиеся на задачах особого рода, таких как определение движения и распознавание лиц.

В главе 20 мы описали, как путем анализа эффекта зрительных стимулов на последовательно связанные кортикальные клетки можно понять процессы переработки информации в первичной зрительной коре. Этот подход приблизил нас к пониманию клеточных механизмов анализа *формы* в каждой отдельной точке поля зрения. Сейчас же нашей задачей является изучить, каким образом в коре кодируются другие аспекты восприятия, такие как *цвет* и *движение*, и каким образом эти свойства могут быть затем собраны воедино при восприятии цельного изображения.

Мы уже описали поточечное представление сетчатки в области зрительной зоны (V_1) и то, каким образом происходит разделение информации от обоих глаз в колонках глазного доминирования. В пределах данной ретинотопической карты существует функциональное деление; так, например, определенные колонки клеток реагируют на линии строго определенной ориентации. Мы начинаем эту главу исследованием взаимосвязи между колонками глазного доминирования и ориентационными колонками, затем мы рассмотрим доказательства того, что в зрительной коре движение и цвет анализируются параллельно различными группами клеток. И, наконец, мы рассмотрим примеры высшего уровня обработки зрительной информации в зонах, расположенных вне первичной зрительной коры.

§ 1. Колонки с доминированием одного глаза и ориентационные колонки

В ранних экспериментах Хьюбеля и Визеля было показано, что клетки коры со сходными свойствами образуют между собой связи, формируя вертикально организованные колонки[1, 2]. В экспериментах с проникающим электродом, при его продвижении вглубь зрительной коры, у всех клеток обнаруживалась одна и та же ориентация оси рецептивного поля, то же глазное доминирование и одно и то же расположение рецептивного поля. Мы уже упоминали колонки предпочтения определенного глаза (eye preference). Как обсуждалось в главе 20, сигналы от обоих глаз разделяются в пределах слоя 4, где кортикальные нейроны получают сигналы только от одного глаза. В любой данной колонке, выходящей выше или ниже слоя 4, все кортикальные нейроны, даже те, которые получают информацию от обоих глаз, имеют одинаковое глазное предпочтение (либо левый, либо правый глаз). Таким образом, существуют колонки с предпочтительной, или по-другому, с доминирующей реакцией на сигналы от одного определенного глаза (*глазодоминантные колонки*). На рис. 21.1 иллюстрируются различия в таком глазном доминировании в нейронах стриарной коры обезьяны. Клетки (всего 1 116) подразделяются на 7 групп. Группы 1 и 7 получают информацию только от одного из глаз и находятся в слое 4 коры. В группах 2, 3, 5 и 6 эффект одного из глаз сильнее, нежели другого, и только в средней группе 4 оба глаза имеют примерно одинаково выраженные эффекты. Из гистограммы также ясно, что большинство клеток отвечают преимущественно на сигналы от правого или левого глаза.



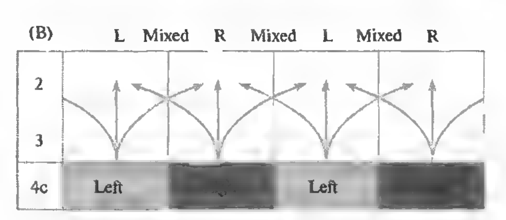


Рис. 21.1. Физиологическая демонстрация глазодоминантных колонок. (А) Глазные предпочтения в 1 116 клетках в зоне V_1 у 28 макак резус. Большинство клеток (группы со второй по шестую) получают информацию от .обоих глаз. (В) Диаграмма, показывающая каким образом информация от двух глаз, направляющаяся в слой 4 коры, комбинируется в более поверхностных слоях при помощи горизонтальных и косых соединений, дающих клетки с бинокулярными полями.

Fig. 21.1. Physiological Demonstration of Ocular Dominance Columns. (A) Eye preference of 1 116 cells in V_1 of 28 rhesus monkeys. Most cells (groups 2 through 6) are driven by both eyes. (B) Diagram to show how inputs from two eyes arriving in layer 4 of the cortex are combined in more superficial layers through horizontal or oblique connections to create cells with binocular fields. (After Hubel and Wiesel, 1968; Hubel, 1988.)

Как было описано в главе 20, глазодоминантные колонки формируют своеобразный перемежающийся рисунок зрительной коры. Паттерны глазного предпочтения в коре могут быть непосредственно визуализованы, используя оптические сигналы от искусственно введенных красителей[3)–5)]. При помощи этого метода можно исследовать активность больших участках коры во время предъявления животному различных зрительных стимулов. На рис. 21.2 показаны глазодоминантные колонки, выявленные в таком эксперименте. Полосатый (перемежающийся) рисунок активности напоминает тот, который может быть получен при введении радиоактивных меток в один глаз (см. рис. 20.8 в главе 20). При предъявлении зрительного стимула только одному глазу выявляются полоски клеток, получающих сигналы только от этого глаза, отделенные друг от друга клетками с невысоким уровнем активности. Проекции этих полосок от поверхно-

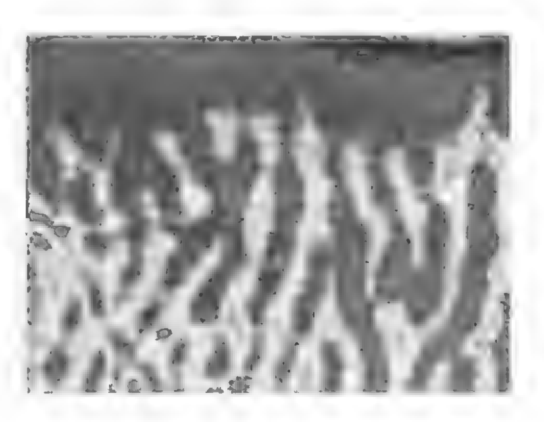
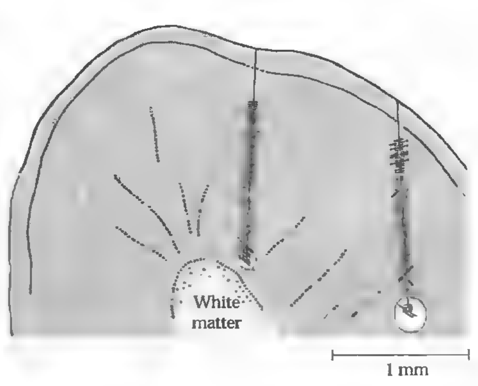


Рис. 21.2. Выявление глазодоминантных колонок с помощью оптической регистрации. Чувствительная камера обнаруживает оптический сигнал в коре обезьяны во время стимуляции только одного глаза. Изменения в интенсивности сигнала кодируются при помощи цвета, поэтому активные зоны выглядят в виде светлых полос. Паттерн светлых полос соответствует колонкам глазного доминирования, выявляемым при маркировании анатомическими методами (см. рис. 20.8).

Fig. 21.2. Display of Ocular Dominance Columns by Optical Imaging. A sensitive camera detects changes in light reflected from the monkey cortex following activity induced in just one eye. The intensity changes are color-coded so that active areas are light. The pattern of light stripes corresponds to ocular dominance columns revealed by anatomical labeling methods (see Figure 20.8). (After Tso et al., 1990.)



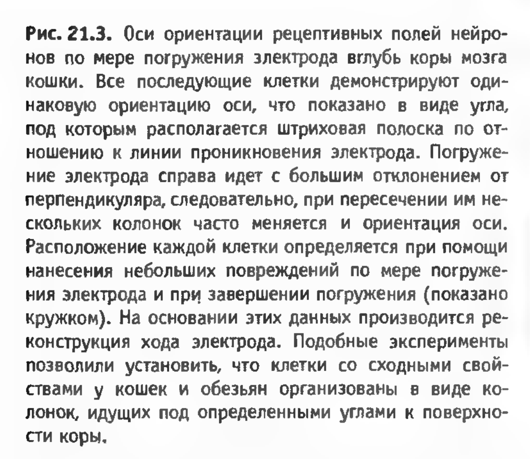


Рис. 21.3. Оси ориентации рецептивных полей нейронов по мере погружения электрода вглубь коры мозга кошки. Все последующие клетки демонстрируют одинаковую ориентацию оси, что показано в виде угла, под которым располагается штриховая полоска по отношению к линии проникновения электрода. Погружение электрода справа идет с большим отклонением от перпендикуляра, следовательно, при пересечении им нескольких колонок часто меняется и ориентация оси. Расположение каждой клетки определяется при помощи нанесения небольших повреждений по мере погружения электрода и при завершении погружения (показано кружком). На основании этих данных производится реконструкция хода электрода. Подобные эксперименты позволили установить, что клетки со сходными свойствами у кошек и обезьян организованы в виде колонок, идущих под определенными углами к поверхности коры.

Fig. 21.3. Axis Orientation of Receptive Fields of Neurons encountered as an electrode traverses the cortex of a cat. Cell after cell tends to have the same axis orientation, indicated by the angle of the bar to the electrode track. The penetration to the right is more oblique; consequently, the track crosses several columns and the axis orientations change frequently. The position of each cell is determined by making lesions repeatedly and at the end of the penetration (circle), and reconstructing the electrode track in serial sections of the brain. Such experiments have established that cat and monkey cells with similar axis orientation are stacked in columns running at right angles to the cortical surface. (After Hubel and Wiesel, 1962.)

сти коры вглубь образуют колонки глазного доминирования, делящие ретинотопическую карту на более мелкие области. Таким образом, информация о предмете, находящемся в одном и том же месте зрительного поля, идущая от обоих глаз, интегрируется в пределах зрительной коры как соседними клетками, так и соседними колонками (рис. 21.1B).

Ориентационные колонки

Какие другие функциональные объединения возможны для зрительных нейронов в зоне V_1?

В главе 20 мы описали ориентационные предпочтения простых и комплексных клеток. Таким образом, логичен вопрос: является ли данная особенность систематически повторяющейся в зрительной коре? Репрезентативный эксперимент, отвечающий на этот вопрос, представлен на рис. 21.3. Микроэлектрод погружается перпендикулярно поверхности вглубь серого вещества в зоне V_1 мозга кошки. Каждый штрих на этом рисунке показывает расположение одной клетки и предпочтительную ориентацию ее рецептивного поля при предъявлении визуальных раз-

Рис. 21.4. (См. цветную вклейку после с. 640.) Обнаружение ориентационных колонок («волчков») оптическими методами. Рисунок активности зрительной коры был зарегистрирован чувствительной камерой при стимуляции глаза определенным образом ориентированными световыми полосами. (А) Каждая из ориентаций вызывает максимальные изменения в различных регионах (так называемый «ориентационный контур», закодированный разными цветами). Хотя паттерн кажется на первый взгляд беспорядочным, более тщательное исследование выявляет центры, к которым сходятся все направления ориентации, образуя «волчок», как показано на рисунке (В). Заметьте, что каждая из ориентаций встречается только один раз и что последовательность на удивление точная. Центры подобных «волчков» находятся на строго определенном расстоянии друг от друга.

Fig. 21.4. Detection of Orientation Columns (Pinwheels) by Optical Imaging. The activity-dependent reflectance of visual cortex was recorded by a sensitive camera while an eye was stimulated with oriented bars. (A) Each orientation caused maximal changes in different regions (an orientation "contour," encoded by a different color). Although the pattern seems at first disorderly, close inspection reveals centers at which all orientation contours come together in a pinwheel, as shown in (B). Note that each orientation is represented only once and that the sequence is beautifully precise. Such pinwheel centers occur at regular distances from each other. (After Bonhoeffer and Grinvald, 1991.)

дражителей в виде полосок. После погружения электрода в контрольной точке клетки локально повреждаются посредством пропускания электрического тока. Расположение каждой регистрируемой клетки затем реконструируется на основании этих контрольных точек (конечная точка показана кружком в конце пути электрода). Как показано с левой стороны рисунка, первые (начиная с поверхности) 38 клеток наиболее эффективно активировались полосками, расположенными под углом около 90 градусов к вертикальной оси. После погружения на глубину около 0,6 мм ось ориентации рецептивного поля клеток сместилась примерно на 45 градусов. При другом погружении, показанном справа, с более острым углом к поверхности коры, каждая последующая клетка имеет разные варианты ориентации оси. При таком наклонном проникновении оси полей меняются по мере прохождения через разные колонки, имеющие отличающуюся ориентацию. Ориентационные колонки получают сигналы от клеток, рецептивные поля которых значительно перекрываются на поверхности сетчатки.

Информация об организации ориентационных колонок в зрительной коре обезьян и кошек была впервые получена при проведении именно косых (тангенциальных), а не перпендикулярных погружений электрода в глубь коры[2]. При продвижении электрода на каждые 50 мкм в горизонтальном направлении вдоль коры ориентация оси рецептивного поля меняется примерно на 10 градусов, иногда такие последовательные смены ориентации достигают в конечном итоге 180 градусов. Колонки ориентации (20–50 мкм) гораздо уже, чем глазодоминантные колонки (250–500 мкм). Первая анатомическая демонстрация ориентационных колонок, основанная на их разной функциональной активности, была произведена Соколовым, который использовал 2-деоксиглюкозу, хорошо захватывающуюся активными клетками[6]. В результате метаболически активные клетки становились радиоактивными и их расположение можно было видеть на ауторадиограммах. У обезьян и кошек, которым показывали горизонтальные или вертикальные полосы, «полоски» радиоактивности совпадали с расположением колонок вертикальной или горизонтальной ориентации, различимых в коре без всякой окраски. Организация ориентационных колонок изучалась также при помощи оптических методов на живых животных. Примером может служить эксперимент Бонхоеффера и Гринвальда[7], показанный на рис. 21.4. Представление зрительных стимулов различной ориентации приводило к активности в различных кортикальных зонах. Ответы на разные ориентации показаны разными цветами. Удивительной является организация ориентационных колонок по отношению друг к другу. Сначала их организация кажется достаточно беспорядочной. Однако при тщательном исследовании можно заметить определенные центры в виде пестрого «**волчка**», в котором сходятся отдельные точки всех ориентаций. Отсюда клетки, ответственные за определенную ориентацию, расходятся в удивительно правильном порядке. Некоторые волчки ориентированы по часовой стрелке, некоторые — против. Таким образом, ориентация в коре представлена скорее в радиальном, чем в линейном виде. Каждый угол ориентации уникален (возникает только один раз) в пределах цикла[8], вертикальные и горизонтальные контуры занимают несколько большую площадь коры[9]. На каждом квадратном миллиметре коры находятся один или два таких центра,

Рис. 21.5. (См. цветную вклейку после с. 640.) Ориентационные «волчки» и глазодоминантные колонки. (A) Изображение активности области зоны V_1 зрительной коры. Полоски глазного доминирования и ориентационные контуры определены как на рис. 21.2 и 21.4, затем полученные карты были наложены друг на друга. Серые зоны принадлежат контралатеральному глазу. Каждый контур ориентации представлен цветной линией, центр «волчка» стремится к центрам колонок глазного доминирования. Данная карта покрывает примерно 7 мм поверхности коры. (B) Под увеличением показана прямоугольная зона в A. Заметьте, что контуры ориентации стремятся пересечь границы глазного доминирования под определенными углами. Это согласуется с идеей, что каждая область ориентации в пределах одного региона ретинотопической карты (набор контуров всех ориентаций) управляется равноправно обоими глазами.

Fig. 21.5. Orientation Pinwheels and Ocular Dominance Columns. (A) Activity-dependent reflectance was imaged in a region of V_1. Ocular dominance stripes and orientation contours were determined as in Figures 21.2 and 21.4; then the resulting maps were overlaid. Gray areas denote the contralateral eye. Each orientation contour is represented by a colored line, and pinwheel centers tend to occur near the centers of ocular dominance columns. This map extends approximately 7 mm across the cortical surface. (B) An enlargement of the boxed area in A. Note that orientation contours tend to cross ocular dominance boundaries at right angles. This is consistent with the idea that each orientation domain (the set of all orientation contours) is shared by the two eyes for one region of the retinal map. (From Hubener et al., 1997.)

равноудаленных друг от друга. Интересно то, что подобный способ организации коры был предложен ранее, на основании теоретических предпосылок[10)].

Связь между колонками глазного доминирования и ориентационными колонками

При помощи методов оптической микроскопии была также выявлена взаимосвязь между ориентационными колонками и колонками глазного доминирования. Структура корковой активности регистрировалась сначала при стимуляции одного глаза, а затем определялась снова при помощи серии ориентированных световых полос[11, 12)]. Результаты одного такого эксперимента показаны на рис. 21.5A Каждый контур, имеющий свою ориентацию, показан в виде отдельной цветной линии (и изоориентированного контура), зоны глазного доминирования показаны в виде светлых или темных участков. Волчки ориентации четко видны в виде сходящихся изоориентированных контуров, при этом несколько контурных линий между различными волчками обычно пересекают границу глазного доминирования. Таким образом, получается, что большинство ориентационных зон оказывается расщеплено на контралатеральную и ипсилатеральную половинки, получая информацию от обоих глаз с данного места зрительного поля. На самом деле, центр каждого волчка стремится оказаться наиболее близко к центру глазного доминирования[13, 14)], а контуры изоориентации имеют свойство пересекать границы глазного доминирования под определенными углами (рис. 21.5B)[15)].

§ 2. Параллельная обработка информации о форме, движении и цвете

Колонки зрительного доминирования и ориентационные колонки представляют собой только два типа возможной функциональной организации нейронов зрительной коры. Направление движения[16)], пространственная частота (в основном зависящая от размеров рецептивного поля)[17)], несоразмерность изображения (важная детерминанта для восприятия глубины изображения)[18)] также обеспечиваются функциональными образованиями зрительной коры, имеющими вид колонок. Возникает логичный вопрос: каким образом выполняются все необходимые виды анализа изображения для каждой точки в зоне коры, куда проецируется ретинотопическая карта? Эффект «смешивания» функциональных колонок, показанный на рис. 21.5, дает частичный ответ на этот вопрос. В самом деле, задолго до использования оптических методов для поиска подобных взаимосвязей, Хьюбель и Визель[19)] предложили концептуальную схему того, что они назвали **«сверхколонка»** (hypercolumn). Под этим термином они понимали такое объединение нейронов, в котором представлены все возможные ориентации соответствующих областей зрительных полей обоих глаз. Согласно этому представлению соседние сверхколонки анализируют информацию таким же образом, как и соседние перекрывающиеся части зрительных полей. Тем не менее остается пока трудной задачей объединить эту точку зрения с данными современных методов анализа изображения.

Крупноклеточные, мелкоклеточные и кониоклеточные «каналы» передачи информации

В главе 20 мы упомянули, что ядра ЛКТ разделяются на крупноклеточные (magnocellular), мелкоклеточные (parvocellular) и кониоклеточные (koniocellular) слои (соответственно, М-, Р- и К-слои). Каждый из них получает информацию от определенных классов ганглиозных клеток сетчатки и проецируется в определенный слой зоны V_1 (рис. 21.7). Нейроны в Р- и М-слоях ЛКТ проецируются в различные отделы слоя 4 в пределах зоны V_1[20]. Слой 4 подразделяется на подслои A, B и C, а последний, еще и на 4Cα и 4Cβ. В зрительной коре обезьян сигналы от мелкоклеточного слоя идут в слой 4A и 4Cβ, а также в верхнюю часть слоя 6. Нейроны этого Р-пути чувствительны к цвету, требуют относительно высокого контраста и проявляют монотонный характер активности. Клетки в слое 4Cα получают сигналы от крупноклеточного слоя и, в свою очередь, направляются в слой 4B. М-нейроны имеют короткие ответы и не чувствительны к цвету, хотя гораздо более чувствительны к контрасту, нежели Р-нейроны[21]. К-слои ЛКТ могут участвовать в обработке цветовой информации. Клетки этого слоя направляют отростки непосредственно к коре V_1, их цитохромоксидазные метки можно обнаружить в слое 2 и 3[22, 23].

Цитохромоксидазные метки в виде «полос» и «пятен»

При использовании гистохимических реакций для визуализации фермента цитохромоксидазы, уровень которого связан с метаболической активностью нейрона[24], в пределах зоны V_1 обнаруживается прерывистый или пятнистый паттерн активности. Зоны с подобными метками, называемыми **«пятнами»** (blobs), представляют собой округлые скопления клеток в основном в слоях 2 и 3, а также в 5 и 6. «Пятна» имеют более богатую васкуляризацию, чем окружающие ткани[25]. У приматов «пятна» активности цитохромоксидазы организованы строго в параллельные ряды с расстоянием между ними около 0,5 мм, соответствуя центрам глазодоминантных колонок[26, 27]. Электрофизиологические данные показывают, что большинство клеток в пределах этих «пятен» проявляют чувствительность к свету и имеют концентрические поля с "on"- и "off"-зонами[28]. Эти наблюдения привели к оригинальному предположению, что «пятна» активности цитохромоксидазы представляют собой отдельные пути для цвета, перемешанные с корковыми колонками глазного доминирования и ориентации[29]. Однако последующие исследования показали, что данные «пятна» получают также сигналы от М-подслоев слоя 4C[30] и имеют нейроны, проявляющие М-подобные свойства[31]. Таким образом, «пятнистые» области представляют собой еще не полностью понимаемые зоны для сортировки и комбинации М-, Р- и К-путей. Подобного рода функциональное разнообразие связано с тем, что зоны «пятна» и вне «пятна» проецируются в специфические подзоны в пределах корковой зоны V_2.

Проекции в зрительную зону 2 (V_2)

При окрашивании на цитохромоксидазу зоны V_2 выявляется паттерн, отличный от того, который виден в зоне V_1[32]. Окрашивание происходит в виде серии тонких и толстых полосок, перемежающихся с более бледными зонами с меньшей активностью фермента (рис. 21.6). Эти параллельные полоски идут

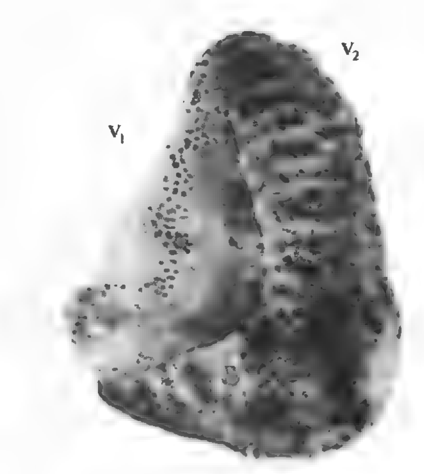


Рис. 21.6. «Пятна» в зоне V_1 и «полоски» в зоне V_2 зрительной коры обезьян, окрашенной на цитохромоксидазу. Пятна организованы в виде узора «в горошек». Можно различить четкую границу между зонами V_1 и V_2. По этой линии «пятна» переходят в «полоски», толстые и тонкие, идущие под определенным углом к границе.

Fig. 21.6. Blobs in V_1 and Stripes in V_2 of monkey visual cortex stained by cytochrome oxidase. The blobs are arranged in a polka-dot pattern. A clear boundary can be discerned between V_1 and V_2. At this line the blobs change to stripes, thick and thin, running at right angles to the border. (From Livingstone and Hubel, 1988.)

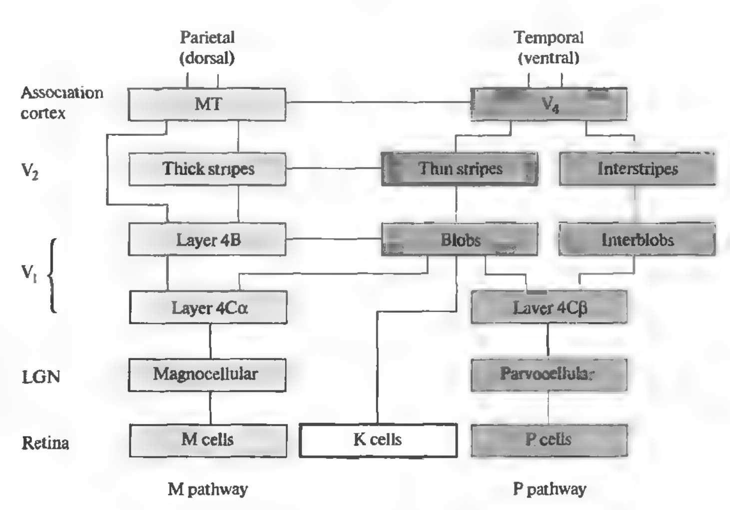


Рис. 21.7. Схематическая организация М-, Р- и К-каналов, направляющихся в зрительную кору. Функционально различные слои ЛКТ направляют отростки к различным слоям в V_1. К-слои проецируются в «пятна» в слое 2 и 3. М- и Р-слои области 4С могут взаимодействовать предпочтительно с областями «пятна» и с областями, расположенными между пятен в слоях 2 и 3. «Пятна» проецируются преимущественно в тонкие полоски в V_2. Тонкие полоски проецируются в V_4. Толстые полосы в V_2 получают информацию от слоя 4В в V_1 и проецируются в ассоциативную зону МТ (V_5). М-каналы проецируются в дорзальную (теменную) зрительную кору, где происходит анализ движения. Р-каналы проецируются предпочтительно в зону V_4, где осуществляется обработка информации о цвете.

Fig. 21.7. Schematic Organization of M, P, and K Channels to Visual Cortex. Functionally distinct layers of the LGN project to different layers in V_1. K layers project to blobs in layers 2 and 3. The M and P layers of 4C may interact preferentially with blob and interblob regions in layers 2 and 3. Blobs project preferentially to thin stripes in V_2. Thin stripes project to V_4. Thick stripes in V_2 receive input from layer 4B in V_1 and project to association area MT (V_5). M channels appear to project to dorsal (parietal) visual cortex, where movement is analyzed; P channels project preferentially to area V_4, where color vision is processed. (After Merigan and Maunsell, 1993.)

под определенными углами от границы между зонами V_1 и V_2. После введения фермента пероксидазы хрена в окрашенные зоны V_1, он захватывается терминалями аксона и транспортируется ретроградно, показывая, что нейрон, отростки которого проецируются в пределах зоны «пятна», расположен в пределах тонкой полосы окрашивания зоны V_2 зрительной коры. Эти связи взаимны: при инъекции в тонкие полоски возникает окрашивание в области «пятен»[33]. И наоборот, области между «пятнами» образуют связи с бледными широкими полосами, которые получают в основном информацию от больших клеток из слоев 4В и 4Сα. Примечательно, что это функциональное подразделение может быть выявлено даже на молекулярном уровне: моноклональные антитела Cat-301 в основном маркируют крупноклеточные пути в пределах зрительной коры обезьяны[34].

Ассоциативные зоны зрительной коры

Значительные усилия были потрачены для понимания процесса переработки информации в М- и Р-каналах зрительной коры. Подобные исследования были вызваны функциональными и анатомическими различиями ганглиозных клеток сетчатки и нейронов коленчатого тела (рис. 21.7). Дополнительная информация обеспечивалась психофизическими экспериментами, исследованием строения головного мозга, изучением пациентов с различными мозговыми повреждениями[35]. Все это привело к предположению, что различные типы анализа зрительной информации производятся в физически изолированных регионах мозга, в так называемых ассоциативных зонах коры. Дорзальный или париетальный тракт (называемый так потому, что соответствующие зоны коры находятся в теменной доле, расположенной более дорзально по отношению к первичной зрительной коре), как считают, является важным звеном в оценке движения и пространственного взаиморасположения форм — свойств, сходных со свойствами М-каналов, которые мы уже описали. Повреждения дорзального, париетального тракта выражаются в игнорировании участка зрительного поля и нарушении видеомоторной ориентации. Повреждения в области височной коры (вентральнее V_1) уменьшают способность к зрительной идентификации объектов, их цветов и тонких деталей[36] — отражая свойства Р-каналов.

Детекция движения и зона МТ

Если попросить дать краткое определение, что такое зрение, большинство из нас скажет о восприятии объектов, включающем анализ тонких деталей, примерно как это происходит во время чтения этих слов. Однако не менее важной функцией зрения является анализ движения, хотя эта функция и остается в основном непроизвольной и подсознательной (за исключением тех, кто из-за окуломоторного расстройства не может автоматически управлять перемещением зрительного поля).

Как уже было описано, движение анализируется крупноклеточно-париетальной частью зрительного тракта (рис. 21.7). Нейроны крупноклеточного пути чувствительны к движущимся стимулам, это их свойство сохраняется в зонах V_1 и V_2 (в пределах толстых полос), через которые этот путь проходит, направляясь к средневисочной ассоциативной коре (зона МТ, или V_5). Зона МТ также имеет ретинотопическое строение[37]. Нейроны в этой области чувствительны к скорости и направлению движения стимула[38, 39], а также объединены в группы в виде колонок со сходными предпочтительными направлениями движения[40, 41]. Когда небольшие области МТ химически повреждаются при помощи нейротоксина, у обезьяны нарушается способность воспринимать характер движения точек в соответствующих областях зрительного поля, хотя чувствительность к контрастности изображения при этом не меняется.

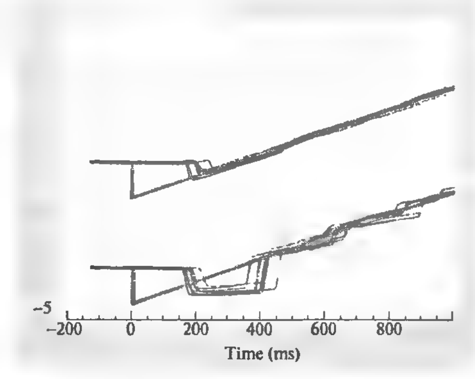


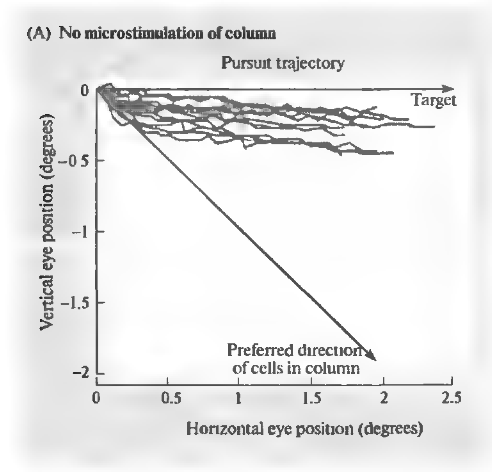
Рис. 21.8. Организация зрительного движения в зоне МТ. Обезьяна была обучена отслеживать взглядом движущиеся предметы (движение стимула показано светлой серой линией). На верхней записи показано положение глаз обезьяны относительно движущегося объекта. После начального резкого быстрого движения предмет проецируется на зрительной ямке (быстрое отклонение глаза вниз), затем глаз точно следует за движением предмета. Однако после введение нейротоксина в область МТ (нижняя запись) первое движение является избыточным и «проскакивает» цель. Дальнейшее слежение идет медленнее, чем это необходимо, как будто была неправильна рассчитана скорость движения предмета.

Fig. 21.8. Organization of Visual Motion in Area MT. A monkey was trained to track a moving target (stimulus path shown by light grey line), and its eye position relative to the target is shown in the upper record. After an initial saccade to center the target on the fovea (the rapid downward eye deflection), the eye closely followed the target path. After injection of a neurotoxin in area MT (lower record), however, the initial saccade was too large and overshot the target, and subsequent tracking was slower than required, as though the computation of target speed were faulty. (From Newsome and Wurtz, 1988.)

Зона МТ и зрительное слежение

Зона МТ играет важную роль в процессе зрительного слежения. Это было показано рядом экспериментов[43], в которых обезьяну обучали следить глазами за движущимся предметом (рис. 21.8). Нормальный паттерн движения глаз показан на верхней записи на рис. 21.8. При этом при движении объекта (траектория начинается от точки 0) глаза фокусировались на нем при помощи быстрого, отрывистого движения (с отклонением вниз через 200 миллисекунд), а затем при помощи аккуратного слежения предмет удерживался в области зрительной ямки. После введения небольшого количества нейротоксина (иботеновой кислоты) в зону МТ, в область представительства центральной ямки, способность обезьяны следить за движущимся объектом значительно нарушалась. В частности, после первого быстрого движения дальнейшая скорость слежения была значительно ниже скорости перемещения объекта. Нарушено было также и само начальное установочное движение глаз (рис. 21.8, нижний пробег). Таким образом, повреждение зоны МТ приводило к тому, что животное теряло способность адекватно отслеживать движение объекта.

Каким же образом рассчитывается движение в зоне МТ? Колонки в этой зоне представляют собой кластеры клеток, одинаково реагирующих на сходное направление движения вдоль ретинотопической карты. Таким образом, движение объекта вдоль сетчатки должно активировать те колонки, которые имеют ори-



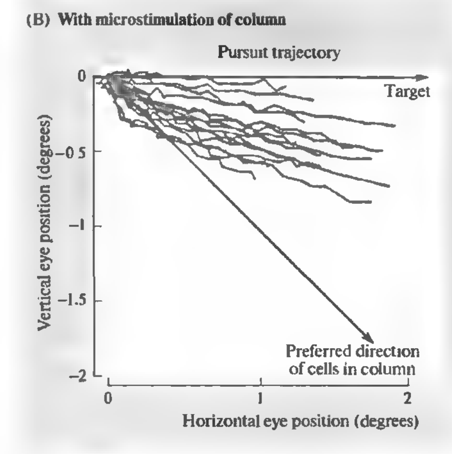


Рис. 21.9. Изменение направления движения глаза при электрической стимуляции в области МТ. (А) Запись движения глаза в ответ на движущийся зрительный стимул. До этого микроэлектрод был введен в область зоны МТ, и было определено предпочтительное направление движения для клеток этой области, которое отличается от направления движения данного стимула (В). При электрической стимуляции зоны МТ результирующий вектор движения отклоняется в сторону. Эти данные дают основания предполагать, что зрительные движения вычисляются как суммарный вектор нескольких предпочтительных направлений в зоне МТ.

Fig. 21.9. The Direction of Eye Movements Can Be Altered by Electrical Stimulation in Area MT. (A) Eye movements were recorded in response to a moving visual target. Earlier, an electrode had been inserted into area MT and the preferred direction of cells in that location was noted. This preferred direction differed from that of the moving target. (B) When this location in area MT was stimulated electrically, the resulting eye movements were biased in the preferred direction of cells in the stimulated region. These results suggest that visual motion is computed as the vector sum of several preferred directions in area MT. (After Groh, Born, and Newsome, 1997.)

ентацию, совпадающую с направлением движения объекта. Но движущиеся зрительные объекты активируют не только одну подобную колонку. Чаще всего они имеют замысловатую траекторию движения, вызывая активацию большого набора нейронов, чувствительных к различным направлениями движения и к разным его углам. Стало быть, для оценки такого движения и расчета усредненного вектора движения потребуются нейрональные вычисления. Нейрональные вычисления, осуществляемые колонками, чувствительными к направлению движения объекта, изучались Ньюсомом с коллегами, с использованием электрической микростимуляции для управления движения глазом у тренированных обезьян[44]. При помощи микроэлектрода регистрировалось предпочтительное направление движения для данной колонки клеток, а затем этот электрод использовался для инъекции небольшого по величине тока для активирования данной колонки в то время, когда осуществлялось следящее движение глазом (рис. 21.9). После этого проводили сравнение следящего движения глаза без стимуляции и при стимуляции МТ, для того чтобы узнать, каким образом происходит сложение двух различных направлений движения в пределах зрительного поля. В контроле глаз строго следует за объектом (рис. 21.9А). При стимуляции электрическим током колонки МТ, предпочтения относительно движения которой отличались от направления движения объекта, результирующее движение глаза было средним между двумя этими направлениями (рис. 21.9В). Вывод: траектория движения используется для расчета среднего вектора для активированных колонок, отслеживающих направление движения. Привлекательной особенностью таких экспериментов является то, что поведение обезьяны (движение глаз) представляет собой тип анализа, выполняемый в высших корковых центрах. Уже давно предполагалось, что подобный расчет среднего вектора используется при выполнении резкого отрывистого движения глаз[45].

Цветовое зрение

Мелкоклеточные нейроны зрительного тракта несут информацию о тонких деталях формы

Рис. 21.10. (См. цветную вклейку после с. 640.) Организация чувствительного к цвету рецептивного поля клеток мелкоклеточных (parvocellular) слоев в ЛКТ обезьяны. (А) Организация рецептивного поля с красным "on"-центром и зеленым "off"-фоном. Подобного типа клетка наилучшим образом отвечает на маленькое или большое красное пятно на нейтральном фоне. Красное пятно на зеленом фоне, однако, вызывает относительно слабый эффект. (B) Пример организации рецептивного поля с различной спектральной чувствительностью

Fig. 21.10. Receptive Field Organization of Cells in parvocellular layers of the monkey LGN, responding to color. (A) Receptive field organization with a red "on" center and a green "off" surround. A cell of this sort would fire best in response to a small or large red spot on a neutral background. A red spot on a green background would be relatively ineffective. (B) Example of receptive field organizations with various spectral sensitivities. (After Wiesel and Hubel, 1966; Hubel, 1988.)

и цвета объектов. На уровне колбочек мы видели четкую корреляцию между нейронными сигналами и длиной волны падающего на сетчатку света (глава 19). Колбочки красного, зеленого и синего типа предпочтительно поглощают свет в области длинно-, средне- и коротковолнового спектра. В принципе, при помощи сравнения активности каждого типа колбочек, нервная система может рассчитать длину волны света. Однако таким ли образом осуществляется восприятие цвета центральным зрительным анализатором?

Конвергенция сигналов от колбочек начинается с уровня горизонтальных клеток, преобразующих эти сигналы в цветовой код, и продолжается в дальнейшем в ганглиозных клетках и мелкоклеточной части латерального коленчатого тела. Свойства подобных ганглиозных клеток и клеток ЛКТ, использующих цветовой код, показаны на рис. 21.10. Значительной трансформации свойств рецептивного поля при прохождении сигнала от зрительного нерва до клеток ЛКТ не наблюдалось[46]. Рецептивные поля клеток ЛКТ на рис. 21.10А имеют концентрическую форму, с красным "on"-центром и зеленой "off"-периферией. Маленькое красное пятно, освещающее центр, вызывает бурный разряд; большее по размеру зеленое пятно, нанесенное не в центральной области, приводит к торможению. Подобного рода клетка отвечает наилучшим образом на красный цвет на нейтральном или голубом, но не на зеленом фоне. Она имеет традиционные свойства «центр-периферия» при ответе на вспышки белого цвета. Другие клетки имеют желто-голубые антагонистические зоны (желтый как смесь красного и зеленого цвета). Разные типы организации рецептивного поля «центр-периферия», наблюдаемые в мелкоклеточных слоях ядра латерального коленчатого тела обезьян, показаны на рис. 21.10В.

Красно-зеленые и желто-голубые нейроны представляют собой примеры клеток, воспринимающих противоположные цвета. Они анализируют длину волны, сравнивая сигналы, поступающие на них от колбочек именно таким образом, как представляли себе Янг и Гельмгольц (глава 19). Красный, зеленый, голубой, желтый, черный и белый шар на бильярдном столе вызывает в этих клетках определенные, уникальные сигналы, которые затем передаются в мозг.

Пути цветного зрения

Картина последовательных шагов коркового анализа цвета и его восприятия была составлена на основании экспериментов Зеки, Хьюбеля, Доу, Ланда и их коллег. Как уже упоминалось, пути передачи информации о цвете отделены, в основном, от путей, занимающихся анализом других свойств, таких как пространственная глубина изображения, движение, контраст и форма. Зеки показал, что мелкоклеточный путь, идущий от зоны V_1 через V_2 к зоне V_4, имеет в своем составе большое количество клеток, кодирующих цветовую информацию[47]. Доказательство ключевой роли зоны V_4 в цветовом зрении было получено при помощи позитронно-эмиссионной томографии и функционального магнитного резонанса при изучении здоровых людей. При проецировании цветовых паттернов на сетчатку повышенная активность была отмечена в области, совпадающей с зоной V_4[48)–50)]. Отдельное восприятие цвета и формы изображения наиболее убедительно демонстрируется в тех редких случаях, когда пациенты страдают потерей цветового зрения из-за изолированного повреждения головного мозга (церебральная **ахроматопсия**)[51, 52)]. Например, описан случай, когда пациент перенес двустороннюю травму мозга в той части, которая располагается перед зоной V_1, что примерно соответствует области V_4[53)]. До повреждения у него было нормальное цветовое зрение, но после травмы он потерял способность различать цвета. Он знал из своего предыдущего опыта, что земляника имеет

красный цвет, а банан — желтый, но после повреждения все виделось ему как будто в черно-белом кино. Другие функции, такие как память и распознавание форм, были лишь незначительно повреждены, и он был способен продолжать свою работу таможенного инспектора(!). При демонстрации ему какого-либо объекта он мог описать, какой цвет должен иметь этот объект, но не мог сопоставить этот цвет с предложенной цветовой шкалой. Однако никаких дефектов ни в речи, ни в распознавании объектов не наблюдалось, только лишь в самом восприятии цветов.

Психофизические исследования у нормальных людей подтверждают отделение информации о цвете от другой информации сразу после восприятия. Подробные описания этого даны в статьях[55] и обзорах Зеки[40], Хьюбеля[56] и Ливингстона[57]. Например, трудно, или даже невозможно, выделить структуру или форму изображения, если не происходит активация крупноклеточных путей зрительного анализатора, воспринимающих зоны контраста на изображении, обычно представленные различными степенями яркости и тени. Мелкоклеточная система, с ее акцентом на восприятие цвета и высокое пространственное разрешение, имеет ограниченные возможности по восприятию формы предметов. Следовательно, цветное изображение сложной структуры с многими компонентами, отражающими зоны с одинаковом уровнем освещенности, для мелкоклеточной системы представляется таким, что не содержит конкретных форм. Это происходит потому, что не работает крупноклеточный путь. Подобным же образом наши ощущения глубины изображения и движения также могут терять свою эффективность, если контраст черно-белого изображения недостаточен для активации крупноклеточных путей. Впечатляющей демонстрацией этого является перемещение рисунка из зеленых и красных полосок вдоль телевизионного экрана. Интенсивность каждого цвета может быть подобрана так, что полоски становятся эквилюминентными (т. е. каждая красная или зеленая полоска излучает такое же эффективное количество света, как и соседняя, хотя и на другой длине волны). Мы по-прежнему видим цветовые полоски, но кажется, что они перестали двигаться.

Цветовое постоянство

Основная проблема в нашем понимании цветного зрения — это понять, каким образом кора определяет, какого цвета тот или иной объект зрительной сцены. В нашем мозге подобного рода расчеты так удачно запрограммированы, что мы интуитивно не осознаем, что здесь может быть какая-либо проблема. Разумеется, иллюстрации голубого цвета в этой книге выглядят голубыми потому, что они отражают свет на короткой длине волны. Из всего, сказанного до сих пор, можно представить себе, что цвета, которые мы видим, определяются просто и непосредственно длиной волны света. Однако для Гельмгольца это не было так очевидно[58]. Он указывал, что яблоко, которое мы видим днем, на закате и в свете свечи выглядит красным. Однако свет, отраженный от его поверхности, содержит гораздо больше красного цвета на закате и гораздо больше желтого в свете свечи. Каким-то образом мозг «приписывает» красный цвет яблоку и не меняет своего восприятия даже при очень различных условиях. Изображение яблока в мозге как бы «не принимает в расчет освещение».

Сходным примером является тон двух корректно экспонированных фотографий, сделанных на одной и той же пленке при дневном свете и в комнате с искусственным светом от электрических ламп. Цвета в дневном свете выглядят более реалистичными, а на фото, сделанном в помещении, имеют больше желтого цвета. Однако мы, тем не менее, совсем не осознаем этой желтизны, когда искусственно освещаем комнату. (Этот феномен до недавнего времени наблюдался очень часто; сейчас вспышки, присутствующие почти на каждом фотоаппарате, имеют спектр, близкий к спектру дневного света). Биологические преимущества цветового постоянства очевидны: зеленые ягоды не должны превращаться в красные на закате; розовые губы не должны становиться желтыми в свете свечи.

Впечатляющая демонстрация цветового постоянства была разработана Ландом[59, 60], что послужило мощным стимулом для нейробиологических исследований в области цветового зрения. Его демонстрация показала, что то, каким мы видим цвет объекта, существенно зависит от света, отраженного от всего изображения, а не только от самого объекта. Мы не можем определить цвет — желтый, зеленый, голубой или белый — для какой либо области, только определяя длину волны отраженного от этой области света. Нам также необходимо знать композицию света, отраженного от соседних областей. Такой стран-

Рис. 21.11. (См. цветную вклейку после с. 640.) Рецептивное поле клетки двойного противопоставления, свойства которой помогают объяснить постоянство цвета. Клетка подобного типа отвечает наилучшим образом на маленькое красное пятно (R), проецируемое на зеленом фоне (G) (верхняя запись), или на зеленое кольцевидное освещение (G) (нижняя запись).

Fig. 21.11. Receptive Field of a Double-Opponent Cell, the properties of which could help to explain color constancy. A cell of this type responds best to a small red spot shining on a green background (upper record), or to green annular illumination (lower record). (After Daw, 1984.)

ный вывод, известный как феномен Ланда, кажется противоположным тому, что нам говорит наша интуиция. Так же как для черного и белого, мозг формирует восприятие цвета, сравнивая свет, падающий на различные области сетчатки, вместо того, чтобы измерять абсолютную яркость и длину волны в одном ее месте. Скорее всего, это как если бы в коре проводилось тотальное сравнение контраста на всех границах изображения для трех различных изображений, видимых через коротко-, средне- и длинноволновые фильтры.

Невозможно дать всеобъемлющее и удовлетворительное описание феномена Ланда в терминах свойств рецептивных полей клеток, кодирующих цвета в областях V_1, V_2 и V_4. Однако один тип клеток, известный как «клетки **двойного противопоставления»** (double opponent cells), имеет свойства, которые могут принимать участие в восприятии цветового постоянства. Первоначально они были описаны Доу[62, 63] в сетчатке золотой рыбки. Затем подобные клетки были обнаружены в коре приматов, но не в ядрах латерального коленчатого тела или в сетчатке[28, 64)–66)]. Следовательно, они участвуют в более поздних стадиях переработки информации о цвете. Вкратце, такие клетки имеют рецептивные поля примерно концентрической формы в виде «центр-периферия», имеющие красно-зеленый или желто-голубой антагонизм (рис. 21.11). Но, в отличие от клеток цветного противопоставления в ЛКТ, в клетках двойного противопоставления каждый цвет вызывает антагонистичные эффекты, как в центре, так и в области периферии. Следовательно, при освещении красным цветом в центре рецептивного поля происходит "on"-разряд, красное же освещение периферии приводит к "off"-разряду. Зеленый цвет в области периферии приводит к "on"-разряду, а в центре — к "off".

Предположим, что мы вызываем разряды при помощи маленького красного пятна в центре рецептивного поля такой клетки, используя в качестве фона монотонное белое освещение. Если мы сейчас увеличим долю красного цвета в монотонном освещении, то уровень сигнала изменится только незначительно: увеличенное возбуждение центральной зоны красным цветом будет компенсироваться более сильным торможением в ответ на освещении периферических зон красным. В самом деле, баланс сигналов с колбочек, воспринимающих красный, зеленый и голубой цвета, различен для центра и периферии, а также колеблется от клетки к клетке в области первичной зрительной коры (V_1), таким образом можно наблюдать непрерывный переход антагонистических оттенков[67, 68)]. Это противоречит цветовым предпочтениям нейронов ЛКТ, которые в значительной степени совпадают с основными воспринимаемыми цветами. Можно предположить, что длинные горизонтальные связи между пятнами (см следующий раздел) играют определенную роль в пространственных взаимосвязях, которые позволяют объяснить феномен Ланда.

§ 3. Интеграция зрительной информации

Горизонтальные связи в пределах первичной зрительной коры

Схема обработки зрительной информации, подобная той, что показана на рис. 21.7, представляет собой рабочую модель, которая помогает придать нашим представлениями более организованный вид. Однако разделение крупноклеточного и мелкоклеточного пути — для определения контраста, движения и глубины изображения, с одной стороны, и цвета и фона — с другой — ни в коей мере не является полным. Взаимодействие между ними обнаруживается даже в области V_1, где сигналы от крупноклеточных клеток можно обнаружить в зоне пятен и между пятнами[20, 30, 69, 70)]. Более того, только зоны V_1 и V_2 четко определены и относительно их границ имеется согласие; дополнительные же зоны ассоциативной зрительной коры не имеют четко очерченных границ. Свойства рецептивных полей клеток,

расположенных в этих зонах, могут сильно варьировать и различные типы зрительных полей могут быть представлены не в столь четко организованном порядке.

В самой зоне V_1 было описано большое разнообразие связей, что предполагает наличие более сложных принципов организации, чем ранее предполагалось. Использование классических методов окраски, таких как окраска (импрегнация) по Гольджи, выявляет доминирование нейронных отростков, которые направляются, в основном, перпендикулярно поверхности коры из слоя в слой. При помощи внутриклеточных инъекций красителей было показано, что кортикальные нейроны имеют также длинные горизонтальные отростки, которые простираются латерально от колонки к колонке (рис. 21.12А)[71)–78)]. Соединения, подобные этим, дают большой вклад в синтез удлиненных рецептивных полей простых клеток слоя 6 зоны V_1: рецептивные поля клеток слоя 5 комбинируются и добавляются конец в конец к полям простых клеток слоя 6 при помощи длинных горизонтальных аксонов. Было обнаружено большое количество простых и комплексных клеток с длинными горизонтальными отростками, имеющими длину более 8 мм, образующих сверхколонки. Отдельный нейрон, таким образом, может интегрировать информацию с целой зоны поверхности сетчатки в несколько раз превосходящей размеры рецептивного поля, измеряемого стандартными методами[79)].

Особенный интерес представляет то, что соединения образуются между колонками, которые имеют сходные ориентационные особенности. Доказательства таких особых соединений были получены при помощи двух дополнительных методов. Во-первых, когда метки были введены в одну колонку, они транспортировались в удаленную сверхколонку, имеющую те же ориентационные предпочтения (рис. 21.12В). Во-вторых, при помощи перекрестной корреляции паттернов активности нейронов, имеющих одни и те же ориентационные предпочтения, но расположенных в разных удаленных друг от друга колонках, можно сделать вывод, что между ними имеются функциональные связи[30, 80, 81)]. Более того, после повреждения сетчатки, кортикальные клетки, лишенные сигнала, также демонстрируют ответы на удаленные стимулы, которые располагаются вне пределов их «нормальных» рецептивных полей[28)].

Рецептивные поля обоих глаз, конвергирующие на кортикальных нейронах

Когда мы смотрим на объект одним или двумя глазами, мы видим только одно изображение, даже если размер и расположение проекции объекта немного отличается на двух сетчатках. Интересно, что еще более 100 лет назад Иоханес Мюллер предположил, что отдельные нервные волокна от обоих глаз могут пересекаться и образовывать связи с одними и теми же клетками в ЦНС. Таким образом, он почти предвидел результаты, полученные Хьюбелем и Визелем[82, 83)]. Они обнаружили, что около 80 % всех кортикальных нейронов в зрительных областях мозга кошки получают сигналы от обоих глаз. Поскольку нейроны, располагающиеся в различных слоях ЛКТ, преимущественно иннервированы либо одним, либо другим глазом, формирование перекрестного взаимодействия между различными глазами становится возможным только в коре. Как уже упоминалось ранее, разделение происходит в слое 4 первичной зрительной коры, где каждая простая клетка получает сигнал только от одного глаза, игнорируя другой. Смешивание сигнала от двух глаз происходит на следующих этапах переключения, то есть в слоях, расположенных глубже (по направлению к белому веществу) и в слоях, более близких к поверхности коры.

Исследование рецептивных полей клеток, получающих бинокулярную информацию, показывает, что (1) рецептивные поля их обычно находятся в абсолютно эквивалентных частях зрительного поля обоих глаз, (2) они имеют одинаковую предпочтительную ориентацию и (3) соответствующие зоны рецептивных полей дополняют эффекты друг друга. Синергичное действие двух глаз на примере простой клетки показано на рис. 21.13. Освещение "on"-зоны левого глаза суммируется с освещением "on"-зоны правого глаза. Одновременное освещение в антагонистических зонах обоих глаз уменьшает текущую активность и усиливает "off"-разряды. Подобные клетки отвечают сигналами на одинаковые изображения в обоих глазах.

Для восприятия глубины изображения существует иная бинокулярная специализация рецептивных полей[84)]. Объект, находящийся за плоскостью фокуса, проецируется в неодинаковые зоны двух сетчаток. Нейроны, обладающие свойствами воспринимать глубину

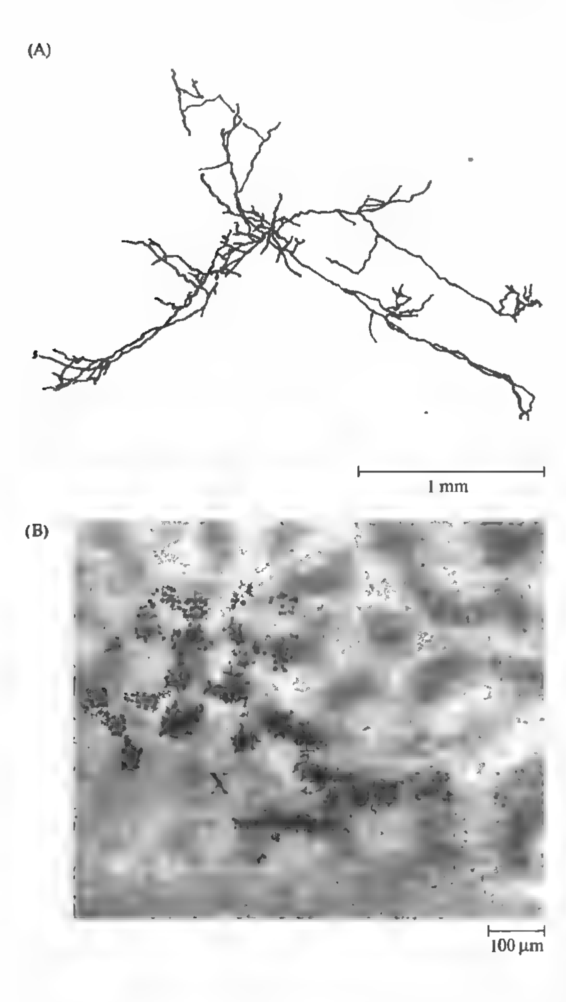


Рис. 21.12. Горизонтальные связи в зрительной коре. (A) Вид поверхности пирамидальной клетки зоны V_1 кошки после введения пероксидазы хрена. Отростки простираются примерно на 3 мм вдоль поверхности коры. Тонкие веточки и синаптические бутоны данного нейрона обнаруживаются в нескольких отдельных кластерах, отделенные друг от друга на расстояние 800 мм и более. (B) Микросферы с метками были введены в область, где клетки имеют предпочтение к вертикальной ориентации (помечено черным "X"). Микросферы захватываются терминалями аксона и транспортируются ретроградно в тела клеток, проецирующих свои отростки в область введения. Колонки вертикальной ориентации были также помечены, используя деоксиглюкозу, во время стимуляции глаза вертикально ориентированными полосками света. Микросферы с метками были обнаружены в зонах, помеченных деоксиглюкозой, что говорит о наличии горизонтальных связей между клетками одной и той же ориентационной чувствительности.

Fig. 21.12. Horizontal Connections in Visual Cortex. (A) Surface view of pyramidal cell in cat V_1, after labeling with horseradish peroxidase. The processes extend for nearly 3 mm across the cortical surface. Fine branches and synaptic boutons of this neuron occurred in several discrete clusters separated by 800 mm or more. (B) Labeled microspheres were injected into a region where cells had vertical orientation preference (large black "X"). The microspheres are taken up by axon terminals and transported back to the somata of cells projecting to the injection site. Vertical orientation columns were also labeled using deoxyglucose during stimulation with vertically oriented bars of light. The labeled microspheres are found in deoxyglucose-labeled areas, showing that horizontal connections occur between cells with the same orientation specificity. (A from Gilbert and Wiesel, 1983; B from Gilbert and Wiesel, 1989; kindly provided by C. Gilbert.)

трехмерного изображения, были обнаружены в первичной и ассоциативной зрительной коре. Для таких клеток оптимальным стимулом является определенным образом ориентированная полоска, расположенная впереди от плоскости фокуса (для одних клеток) или позади ее (для других)[64, 85, 86]. При представлении этой полоски только одному глазу или обоим глазам, однако в пределах плоскости фокуса, сигналы не вызываются. Для того, чтобы клетка ответила разрядами, необходимо, чтобы изображение было различным на обеих сетчатках. Однако такое различное изображение на сетчатках может приводить к активации комплексных клеток первичной зрительной коры и к отклонению глаза для того, чтобы сфокусироваться на объекте[87]. Восприятие глубины осуществляется в высших корковых зонах. Например, кластеры нейронов, имеющие предпочтения для подобного рода различных бинокулярных изображений, были обнаружены в ассоциативной зрительной коре V_5 (зона MT)[88]. При электрической стимуляции этих нейронов у тренированных обезьян нарушалось восприятие глубины изображения.

Связи, объединяющие правое и левое зрительные поля

Отдельная проблема касается того, каким образом две коры (левая и правая) связаны друг с другом и как они работают совместно для формирования единого изображения тела

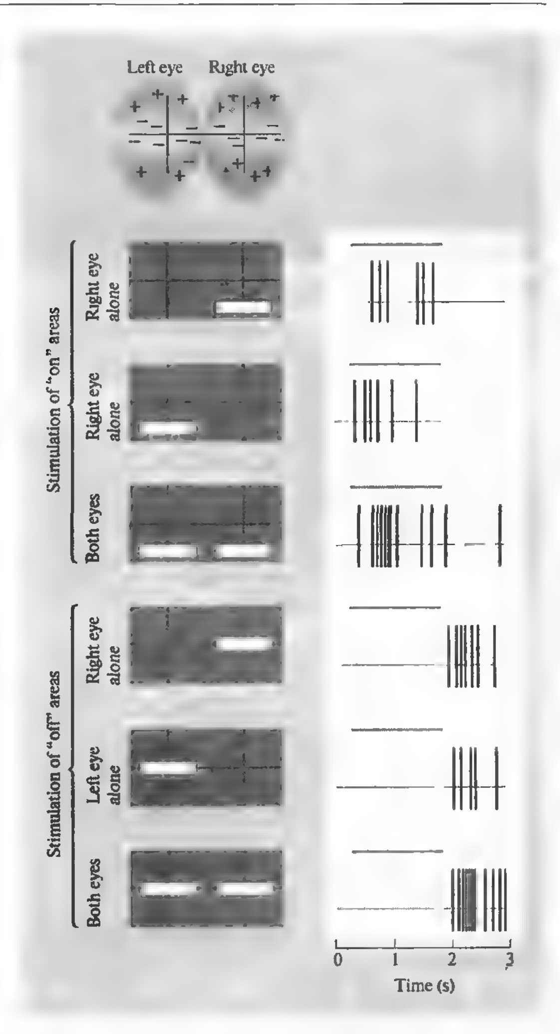


Рис. 21.13. Бинокулярная активация простого кортикального нейрона, имеющего идентичные рецептивные поля в обоих глазах. Одновременное освещение корреспондирующих "on"-зон (+) правого и левого рецептивного поля более эффективно, чем освещение только одного из них (верхние три записи). Аналогичным же образом, стимуляция "off"-зон (−) обоих глаз усиливает "off"-разряды друг друга (нижние три записи). Напротив, клетки, которые занимаются восприятием глубины изображения, имеют рецептивные поля, расположенные в различных зонах зрительного поля для разных глаз. Подобные клетки требуют, чтобы полоска света находилась дальше или ближе к глазу, чем плоскость фокуса

Fig. 21.13. Binocular Activation of a simple cortical neuron that has identical receptive fields in both eyes. Simultaneous illumination of corresponding "on" areas (+) of right and left receptive fields is more effective than stimulation of one alone (upper three records). In the same way, stimulation of "off" areas (−) in the two eyes reinforces each other's "off" discharges (lower three records). In contrast, cells used for depth perception have receptive fields in the two eyes in disparate regions of the visual field. Such cells require that the bar is farther from or closer to the eye than the plane of focus. (After Hubel and Wiesel, 1959.)

и окружающего мира. Каждое полушарие воспринимает только одну половину окружающего нас мира. Это в равной степени справедливо также для восприятия прикосновения, положения тела и является основной особенностью нашего восприятия. Естественным является интерес к тому, что же происходит на их границе. Каким образом две стороны нашего мозга смешивают вместе мир, расположенный справа и слева, таким образом, что мы не можем заметить даже какого-либо намека на «шов» или прерывистость восприятия?

Самым очевидным способом сохранения постоянства восприятия является объединение правого и левого зрительных полей вместе на границе. Для того, чтобы достичь этого, клетка в правом полушарии, которая отвечает на горизонтальную полоску в центре поля зрения, должна каким-то образом быть связана с подобной же клеткой в левом полушарии, которая отвечает за продолжение этой самой полоски. Подобные взаимодействия позволили бы сформировать полную картину окружающего пространства с минимальным количеством связей между двумя полушариями. С другой стороны, бесцельно было бы связывать рецептивные поля, расположенные на границах, направленных в противоположные стороны. Высоко специализированные связи между нейронами с рецептивными полями, расположенными строго по средней границе, были обнаружены в экспериментах. Связи между этими полями идут из одного полушария в другое через мозолистое тело[89].

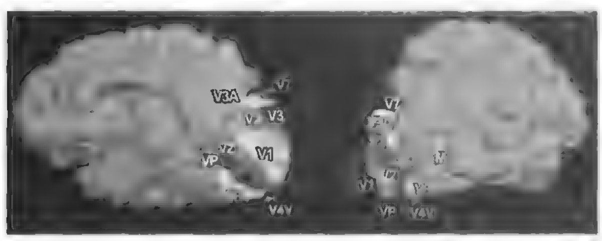


Рис. 21.14. Функциональные карты зрительной коры человека, составленные с помощью магнитного резонанса, на основе предъявления различных зрительных стимулов. С целью избирательной стимуляции первичных и ассоциативных зон зрительной коры зрительная информация, предъявляемая пациентам, была различной. Функционально ограниченные зоны показаны в виде разных цветов. Представлен медиальный (слева) и латеральный (справа) вид правого полушария мозга человека. Первичная зрительная кора (V_1) расположена сзади и непосредственно прилегает к шпорной борозде, в то время как последующие ассоциативные зоны более «высокого» порядка расположены рострально и на значительном расстоянии от шпорной борозды. Зоны, чувствительные к движению (V_3), и зона MT расположены более дорзально, зоны по восприятию цвета и форм, в основном, расположены более вентрально. VP — задне-вентральный, LO — латеральный затылочный, MT — средневисочный.

Fig. 21.14. Functional Maps of Human Visual Cortex can be constructed by presenting visual stimuli to subjects undergoing fMRI. Image content is varied to provide selective stimulation of primary and association visual cortices. Functionally defined zones are color-coded in a medial (left) and lateral (right) view of the right hemisphere of a human brain. The primary visual cortex (V_1) is located most posteriorly and immediately surrounds the calcarine fissure, while successively "higher" association areas are found more anteriorly and at greater distance from the calcarine fissure. Motion sensitive areas (V_3) and area MT are found more dorsally, color- and form-processing areas (V_4, LO) tend to be more ventrally located. VP = ventral posterior; LO = lateral occipital; MT = middle temporal. (Image kindly provided by N. Hadjikhani and R. Tootell.)

§ 4. Что дальше?

В настоящее время стало возможным экспериментально изучить многие из вопросов, поставленных Гельмгольцем, Герингом[90] и, уже в наше время, Ландом, касательно того, каким образом в коре происходит анализ зрительных картин, попадающих на сетчатку. Удивительные особенности строения и слаженного функционирования зрительной коры в плане зрительного восприятия были выявлены при помощи анатомических, физиологических и психофизических экспериментов. Важным принципом, установленным благодаря этим исследованиям, является то, что отдельные пути нейронов, начинающиеся в сетчатке, идут в кору и путь интеграции информации можно продолжить вплоть до уровня сознания (см. Шиллер и Ли, 1991)[91]. Можно, например, обмануть системы восприятия глубины изображения и детекции движения, используя такое освещение, чтобы были активны только мелкоклеточные каналы. Также пациенты с повреждениями в определенных областях коры теряют способность к цветному зрению, при этом способность распознавать образы нарушается только незначительно.

Регистрация работы клеток

Неинвазивные методы регистрации изображений функционирующего мозга предоставляют удивительные возможности для изучения передачи информации как по зрительным путям, так и в целом в пределах головного мозга. Исследование на основе функционального магнитного резонанса способно обнаружить локальные изменения в кровообращении, которые сопровождают усиление нейронной активности[92]. Этот метод может быть использован для картирования первичной и ассоциативной зрительной коры у человека[93)–96], которая имеет сходную организацию со строением зрительной коры обезьяны (рис. 21.14). Таким образом было показано, что у человека, при предъявлении цветовых стимулов, избирательно активируется зона вентральной затылочно-височной коры, которая, предполагается, соответствует зоне V_4 коры обезьяны[50, 97]. Подобным же образом, движущимися стимулами у человека избирательно активируется зона MT (V_5)[98, 99]. Интригующим стало наблюдение, что зона MT у пациентов, страдающих дислексией[100], активируется движущимися стимулами гораздо слабее. Это дает основания полагать, что их неврологический дефицит может быть связан с дисфункцией крупноклеточного пути[101].

Лица и буквы

Из гипотезы иерархической организации коры следует, что должны быть обнаружены

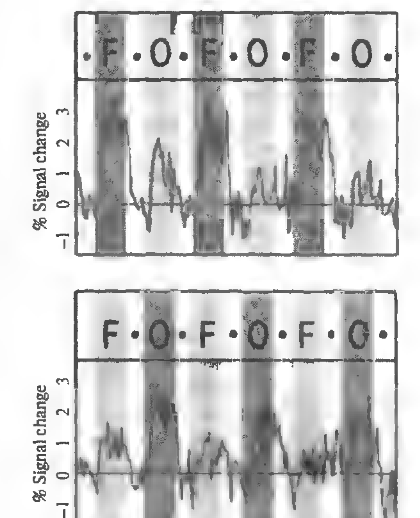


Рис. 21.15. (Рис. 21.15А и 21.15В (срезы зон коры) см. на цветной вклейке после с. 640.) Зоны коры, ответственные за распознавание лиц, выявленные при функциональном магнитно-резонансном исследовании. При этом исследовании пациенту демонстрировались либо изображения лиц, либо другие изображения (например, ложка). При демонстрировании субъекту большего количества изображений лиц (но не других предметов) было зарегистрировано значительное и длительное повышение активности в зоне, расположенной в области веретенообразной борозды (слева на верхней сканограмме). Объекты, не являющиеся лицами, вызывали двустороннюю стимуляцию в областях, расположенных сзади (показано снизу). Усредненные процентные значения изменения сигнала в показанных областях даны справа от сканограмм. Вертикальные темные полоски показывают момент демонстрации лиц (F), или других изображений (O).

Fig. 21.15. Face-Specific Regions of Cortex, as revealed by functional MRI. During fMRI scanning, a subject was shown either faces or nonface objects (e. g., a spoon). A region in the right fusiform gyrus (left side of fMRI) was identified in which pictures of faces, more than objects, produced significant and consistent increases in activity (top). Nonface objects produced bilateral stimulation of further posterior regions (bottom). The average signal percent change in the outlined areas is shown to the right of each fMRI. Vertical shading indicates the presentation of faces (F) or nonface objects (O). (From Kanwisher, McDermott, and Chun, 1997.)

клетки, на которых конвергируют все большие и большие объемы информации об объектах, появляющихся в поле зрения. В самом деле, в зрительных областях более высокого порядка при помощи микроэлектродной регистрации были обнаружены нейроны, которые отвечают специфическим образом на лица[102)]. При регистрации работы клеток было подтверждено, что определенный локус в области затылочно-височной коры (фузиформная извилина) активируется избирательно при просмотре изображений лиц, а не других объектов[103)]. Как можно видеть на верхней «сканограмме» (фронтальный срез) на рис. 21.15, зона коры, отмеченная зеленым цветом, активировалась при просмотре изображений лиц, в то время как другие объекты, не являющиеся лицами (например, ложка), активировали билатеральные зоны, расположенные более каудально. Распознавание лиц может затрагивать и другие области, например центр языка. У правшей правая фузиформная извилина активировалась предпочтительно или исключительно при предъявлении изображений лиц. У двух левшей, при аналогичном тесте, происходила активация этой извилины с левой стороны.

Определенная локализация области распознавания изображений человеческих лиц также подтверждается клиническими данными, когда возникает нарушение только этой, и никакой другой функции обработки зрительной информации. Такое нарушение называется **прозопагнозия** (prosopagnosya)[109, 110)]. В одном таком случае человек, имеющий высокие интеллектуальные способности и хорошую память, не был способен распознавать лица, причем даже лицо своей собственной жены[111)]. Он рассказывал: «Как-то в клубе я увидел какого-то странного субъекта, который удивленно таращился на меня. Я спросил официанта, кто это? Вы будете смеяться. Это я смотрел на себя в зеркало».

Потеря способности к распознаванию может распространяться и на другие категории, когда, например, человек, наблюдающий за птицами, утрачивает способность различать отдельные виды птиц, а делающий ставки на лошадей игрок во время забега не способен отличить одну лошадь от другой. Неврологические и невропатологические исследования показали, что прозопагнозия связана с повреждениями справа и, иногда, с двух сторон затылочно-височной коры[112)]. Другие виды зрительных стимулов также способны вызывать определенные паттерны активности в затылочно-височной коре. Например, последовательности печатных букв (в виде строк) вызывают предпочтительную активацию в нижнезатылочной борозде левого полушария[113)]. Соответственно, повреждения в области затылочно-теменной коры приводят к полной

неспособности воспринимать печатный текст («чистая» алексия)[114]. Являются ли специализированные зоны зрительной коры врожденными, или они появляются с опытом? Хотя можно себе представить, что «нейроны для лиц» могут закладываться в онтогенезе, такое вряд ли возможно для печатного текста. Скорее всего, кора самоподстраивается под важные стимулы на протяжении всей жизни организма. В самом деле, зоны распознавания лиц в коре также активируются, когда эксперту по наблюдению за птицами показывают картинки птиц[115]. Формируются ли специфические регионы коры в результате долгой практики? Разрешение и воспроизводимость результатов в методах, позволяющих регистрировать активность клеток, дает нам основания полагать, что уже скоро мы сможем сами непосредственно наблюдать подобного рода изменения, подобно тому, как мы наблюдаем их в двигательной коре во время тренировок (глава 22). Развитие и пластичность неокортекса обсуждается далее, в главе 25.

Выводы

- Нейроны первичной зрительной коры организованы на основе предпочтения сигналов от одного определенного глаза (глазное доминирование) и ориентационной избирательности.
- Расположение колонок глазного доминирования и ориентационных «волчков» может быть обнаружено при помощи регистрации активности нервных клеток оптическими методами с поверхности мозга. Изоориентационные контуры стремятся пересекать зоны глазного доминирования под определенными углами, и каждая зона ориентирования располагается между двумя колонками глазного доминирования.
- Крупноклеточные, мелкоклеточные и кониоклеточные пути образуют параллельные каналы, несущие информацию от сетчатки в зрительную кору. Крупноклеточные нейроны чувствительны к движению и контрасту. Мелкоклеточные нейроны сигнализируют о пространственных деталях изображения и его цвете. Кониоклеточные нейроны переносят цветовую информацию непосредственно к участкам коры, выявляемым как «пятна» активности цитохромоксидазы.
- «Пятна» цитохромоксидазы располагаются в центре каждой глазодоминантной колонки и представляют собой области синтеза сигналов в первичной зрительной коре (V_1).
- Чередующиеся полоски коры с высокой и низкой активностью цитохромоксидазы в области V_2 особым образом взаимосвязаны с подобными же полосками в области V_1.
- Распознавание движения обеспечивается нейронами V_5 (зона МТ) париетальной коры.
- Зона V_4 в височно-затылочной области содержит в основном нейроны, кодирующие цветовую информацию.
- Клетки двойного противопоставления (double-opponent cells) в зрительной коре имеют свойства, играющие важную роль в восприятии феномена постоянства цвета.
- Интеграция рецептивных полей в коре обеспечивается длинными горизонтальными аксонами, которые соединяют между собой колонки клеток, имеющих близкие свойства.
- Большинство нейронов коры получает сигналы от соответствующих точек зрительного поля обоих глаз, но некоторые нейроны отвечают на стимулы, расположенные в различных точках двух сетчаток. При помощи подобных отличий в восприятии изображения двумя глазами в области МТ происходит стереоскопическое восприятие глубины изображения.
- Функциональные магнитно-резонансные исследования позволяют провести картирование зон активности в пределах первичной и вторичной зрительной коры, а также в более высокоспециализированных областях коры человека.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Callaway, E. M. 1998. Local circuits in primary visual cortex of the macaque monkey. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 47–74.
- Casagrande, V. A. 1994. A third parallel visual pathway to primate area V1. *Trends Neurosci.* 17: 305–310.
- Courtney, S. M., and Ungerleider, L. G. 1997. What fMRI has taught us about human vision. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 554–561.
- Hubel, D. H. 1988. *Eye, Brain and Vision.* Scientific American Library, New York.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1977. Functional architecture of macaque monkey visual cortex (Ferrier Lecture). *Proc. R. Soc. Lond. B* 198: 1–59.
- Komatsu, H. 1998. Mechanisms of central color vision. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 503–508.
- Merigan, W. H., and Maunsell, J. H. R. 1993. How parallel are the primate visual pathways? *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 369–402.
- Newsome, W. T., and Wurtz, R. H. 1988. Probing visual cortical function with discrete chemical lesions. *Trends Neurosci.* 11: 394–400.
- Tootell, R. B., Dale, A. M., Sereno, M. I., and Malach, R. 1996. New images from human visual cortex. *Trends Neurosci.* 19: 481–489.
- Zeki, S. 1990. Colour vision and functional specialisation in the visual cortex. *Disc. Neurosci.* 6: 1–64.

Статьи

- Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. 1989. Columnar specificity of intrinsic horizontal and corticocortical connections in cat visual cortetx. *J. Neurosci.* 9: 2432–2442.
- Groh, J. M., Born, R. T., and Newsome, W. T. 1997. How is a sensory map read out? Effects of microstimulation in visual area MT on saccades and smooth pursuit eye movements. *J. Neurosci.* 17: 4312–4330.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol.* 160: 106–154.
- Hubener, M., Shoham, D., Grinvald, A., and Bonhoeffer, T. 1997. Spatial relationships among three columnar systems in cat area 17. *J. Neurosci.* 17: 9270–9284.
- Kanwisher, N., McDermott, J., and Chun, M. M. 1997. The fusiform face area: A module in human extrastriate cortex specialized for face perception. *J. Neurosci.* 17: 4302–4311.
- Land, E. H. 1983. Recent advances in retinex theory and some implications for cortical computations: Color vision and the natural image. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5163–5169.
- Livingstone, M. S., and Hubel, D. H. 1987. Connections between layer 4B of area 17 and the thick cytochrome oxidase stripes of area 18 in the squirrel monkey. *J. Neurosci.* 7: 3371–3377.
- Zeki, S., Watson, J. D., Lueck, C. J., Friston, K. J., Kennard, C., and Frackowiack, R. S. 1991. A direct demonstration of functional specialization in human visual cortex. *J. Neurosci.* 11: 641–649.

Цитированная литература

1. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1963. *J. Physiol.* 165: 559–568.
2. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1974. *J. Comp. Neurol.* 158: 267–294.
3. Grinvald, A., et al. 1986. *Nature* 324: 361–364.
4. Ts'o, D. Y., et al. 1990. *Science* 249: 417–420.
5. Blasdel, G. G. 1989. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 561–581.
6. Sokoloff, L. 1977. *J. Neurochem.* 29: 13–26.
7. Bonhoeffer, T., and Grinvald, A. 1991. *Nature* 353: 429–431.
8. Swindale, N. V., Matsubara, J. A., and Cynader, M. S. 1987. *J. Neurosci.* 7: 1414–1427.
9. Coppola, D. M., et al. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2621–2623.
10. Linsker, R. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8779–8783.
11. Hubener, M., et al. 1997. *J. Neurosci.* 17: 9270–9284.
12. Blasdel, G. G., Obermayer, K., and Kiorpes, L. 1995. *Vis. Neurosci.* 12: 589–603.
13. Crair, M. C., et al. 1997. *J. Neurophysiol.* 77: 3381–3385.
14. Löwel, S., et al. 1998. *Eur. J. Neurosci.* 10: 2629–2643.
15. Obermayer, K., and Blasdel, G. G. 1993. *J. Neurosci.* 13: 4114–4129.
16. Weliky, M., Bosking, W. H., and Fitzpatrick, D. 1996. *Nature* 379: 725–728.
17. Tootell, R. B., Silverman, M. S., and De Valois, R. 1981. *Science* 214: 813–815.
18. LeVay, S., and Voight, T. 1988. *Vis. Neurosci.* 1: 395–414.
19. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1972. *J. Comp. Neurol.* 146: 421–450.
20. Fitzpatrick, D., Lund, J. S., and Blasdel, G. G. 1985. *J. Neurosci.* 5: 3329–3349.
21. Sclar, G., Maunsell, J. H. R., and Lennie, P. 1990. *Vision Res.* 30: 1–10.

22. Lachica, E. A., and Casagrande, V. A. 1992. *J. Comp. Neurol.* 319: 141–158.
23. Komatsu, H. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 503–508.
24. Wong-Riley, M. 1989. *Trends Neurosci.* 12: 94–101.
25. Zheng, D., LaMantia, A. S., and Purves, D. 1991. *J. Neurosci.* 11: 2622–2629.
26. Livingstone, M. S., and Hubel, D. H. 1984. *J. Neurosci.* 4: 309–356.
27. Hendrickson, A. E. 1985. *Trends Neurosci.* 8: 406–410.
28. Ts'o, D. Y., and Gilbert, C. D. 1988. *J. Neurosci.* 8: 1712–1727.
29. Livingstone, M. S., and Hubel, D. 1988. *Science* 240: 740–749.
30. Yabuta, N. H., and Callaway, E. M. 1998. *J. Neurosci.* 18: 9489–9499.
31. Merigan, W. H., and Maunsell, J. H. R. 1993. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 369–402.
32. Olavarria, J. F., and Van Essen, D. C. 1997. *Cerebral Cortex* 7: 395–404.
33. Livingstone, M. S., and Hubel, D. H. 1987. *J. Neurosci.* 7: 3371–3377.
34. DeYoe, E. A., et al. 1990. *Vis. Neurosci.* 5: 67–81.
35. Grusser, O. J., and Landis, T. 1991. *Visual Agnosias.* Voi. 12 of *Vision and Visual Dysfunction.* CRC, Boca Raton, FL.
36. Ungerleider, L. G., and Mishkin, M. 1982. In *The Analysis of Visual Behavior.* MIT Press, Cambridge, MA, pp. 549–586.
37. Maunsell, J. H., and Newsome, W. T. 1987. *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 363–401.
38. Zeki, S. M. 1974. *J. Physiol.* 236: 549–573.
39. Maunsell, J. H. R., and Van Essen, D. C. 1983. *J. Neurophysiol.* 49: 1127–1147.
40. Albright, T. D. 1984. *J. Neurophysiol.* 52: 1106–1130.
41. Malonek, D., Tootell, R. B. H., and Grinvald, A. 1994. *Proc. R. Soc. Lond. B* 258: 109–119.
42. Newsome, W. T., and Pare, E. B. 1988. *J. Neurosci.* 8: 2201–2211.
43. Dursteler, R. M., Wurtz, R. H., and Newsome, W. T. 1987. *J. Neurophysiol.* 57: 1262–1287.
44. Groh, J. M., Born, R. T., and Newsome, W. T. 1997. *J. Neurosci.* 17: 4312–4330.
45. Robinson, D. A., and Fuchs, A. F. 1969. *J. Neurophysiol.* 32: 637–648.
46. Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. 1966. *J. Neurophysiol.* 29: 1115–1156.
47. Zeki, S. 1990. *Disc. Neurosci.* 6: 1–64.
48. Zeki, S., et al. 1991. *J. Neurosci.* 11: 641–649.
49. Takechi, H., et al. 1997. *Neurosci. Lett.* 230: 17–20.
50. Sakai, K., et al. 1995. *Proc. R. Soc. Lond. B* 261: 89–98.
51. Cowey, A., and Heywood, C. A. 1995. *Behav. Brain Res.* 71: 89–100.
52. Heywood, C. A., Kentridge, R. W., and Cowey, A. 1998. *Exp. Brain Res.* 123: 145–153.
53. Pearlman, A. L., Birch, J., and Meadows, J. C. 1979. *Ann. Neurol.* 5: 253–261.
54. Leonards, U., and Singer, W. 1997. *Vision Res.* 37: 1129–1140.
55. Barbur, J. L., Harlow, A. J., and Plant, G. T. 1994. *Proc. R. Soc. Lond. B* 258: 327–334.
56. Hubel, D. H. 1988. *Eye, Brain and Vision.* Scientific American Library, New York.
57. Livingstone, M. S., and Hubel, D. H. 1987. *J. Neurosci.* 7: 3416–3468.
58. Helmholtz, H. von. 1962/1927. *Helmholtz's Treatise on Physiological Optics.* Dover, New York.
59. Land, E. H. 1986. *Vision Res.* 26: 7–21.
60. Land, E. H. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3078–3080.
61. Land, E. H. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5163–5169.
62. Daw, N. W. 1984. *Trends Neurosci.* 7: 330–335.
63. Daw, N. W. 1968. *J. Physiol.* 197: 567–592.
64. Hubel, D. H., and Livingstone, M. S. 1987. *J. Neurosci.* 7: 3378–3415.
65. Hubel, D. H., and Livingstone, M. S. 1990. *J. Neurosci.* 10: 2223–2237.
66. Tootell, R. B., et al. 1988. *J. Neurosci.* 8: 1569–1593.
67. Lennie, P., Krauskopf, J., and Sclar, G. 1990. *J. Neurosci.* 10: 649–669.
68. Yoshioka, T., Dow, B. M., and Vautin, R. G. 1996. *Behav. Brain Res.* 76: 51–70.
69. Lachica, E. A., Beck, P. D., and Casagrande, V. A. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3566–3570.
70. Sawatari, A., and Callaway, E. M. 1996. *Nature* 380: 442–446.
71. Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. 1979. *Nature* 280: 120–125.
72. Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. 1983. *J. Neurosci.* 3: 1116–1133.
73. Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. 1989. *J. Neurosci.* 9: 2432–2442.
74. Katz, L. C., Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. 1989. *J. Neurosci.* 9: 1389–1399.
75. Callaway, E. M., and Wiser, A. K. 1996. *Vis. Neurosci.* 13: 907–922.
76. Bosking, W. H., et al. 1997. *J. Neurosci.* 17: 2112–2127.
77. Kisvardy, Z. F., et al. 1997. *Cerebral Cortex* 7: 605–618.
78. Schmidt, K. E., et al. 1997. *J. Neurosci.* 17: 5480–5492.
79. Ts'o, D. Y., Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. 1986. *J. Neurosci.* 6: 1160–1170.
80. Gray, C. M., et al. 1989. *Nature* 338: 334–337.
81. Schwarz, C., and Bolz, J. 1991. *J. Neurosci.* 11: 2995–3007.

82. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1962. *J. Physiol.* 160: 106–154.
83. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1959. *J. Physiol.* 148: 574–591.
84. Barlow, H. B., Blakemore, C., and Pettigrew, J. D. 1967. *J. Physiol.* 193: 327–342.
85. Fischer, B., and Poggio, G. F. 1979. *Proc. R. Soc. Lond. B* 204: 409–414.
86. Ferster, D. 1981. *J. Physiol.* 311: 623–655.
87. Masson, G. S., Busettini, C., and Miles, F. A. 1997. *Nature* 389: 283–286.
88. DeAngelis, G. C., Cumming, B. G., and Newsome, W. T. 1998. *Nature* 394: 677–680.
89. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1967. *J. Neurophysiol.* 30: 1561–1573.
90. Hering, E. 1986. *Outline of a Theory of the Light Sense.* Harvard University Press, Cambridge, MA.
91. Schiller, P. H., and Lee, K. 1991. *Science* 251: 1251–1253.
92. Fox, P. T., and Raichle, M. E. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1140–1144.
93. Sereno, M. I., et al. 1995. *Science* 268: 889–893.
94. DeYoe, E. A., et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2382–2386.
95. Tootell, R. B., et al. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 481–489.
96. Courtney, S. M., and Ungerleider, L. G. 1997. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 554–561.
97. Martin, A., et al. 1995. *Science* 270: 102–105.
98. Watson, J. D., et al. 1993. *Cerebral Cortex* 3: 79–94.
99. Tootell, R. B., et al. 1995. *J. Neurosci.* 15: 3215–3230.
100. Eden, G. F., et al. 1996. *Nature* 382: 66–69.
101. Livingstone, M. S., et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7943–7947.
102. Damasio, A. R., Tranel, D., and Damasio, H. 1990. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 89–109.
103. Kanwisher, N., McDermott, J., and Chun, M. M. 1997. *J. Neurosci.* 17: 4302–4311.
104. Sperry, R. W. 1970. *Proc. Res. Assoc. Nerv. Ment. Dis.* 48: 123–138.
105. Gazzaniga, M. S. 2000. *Brain* 123: 1293–1326.
106. Gazzaniga, M. S. 1989. *Science* 245: 947–952.
107. Shatz, C. J. 1977. *J. Comp. Neurol.* 173: 497–518.
108. Berlucchi, G., and Rizzolatti, G. 1968. *Science* 159: 308–310.
109. Farah, M. J. 1990. *Visual Agnosia.* MIT Press, Cambridge, MA.
110. De Renzi, E. 1997. Prosopagnosia. In *Behavioral Neurology and Neuropsychology.* McGraw-Hill, New York, pp. 245–255.
111. Pallis, C. A. 1955. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 18: 218–224.
112. Meadows, J. C. 1974. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 37: 489–501.
113. Puce, A., et al. 1996. *J. Neurosci.* 16: 5205–5215.
114. Damasio, A. R., and Damasio, H. 1983. *Neurology* 33: 1573–1583.
115. Gauthier, I., et al. 2000. *Nature Neurosci.* 3: 191–197.

Глава 22

Клеточные механизмы двигательного контроля

Так же как в *сенсорных системах*, нейрональная организация двигательного контроля является иерархической, с интеграцией простых элементов в более комплексные системы нейронов. Сенсорные системы и двигательные команды более высокого порядка сходятся на «общем конечном пути», каким является спинальный мотонейрон, контролирующий скелетные мышцы. Один из входов на мотонейрон представляет собой путь, идущий от мышечных рецепторов растяжения (афференты группы Ia). Каждый Ia афферент дивергирует для обеспечения контакта со всеми мотонейронами, которые иннервируют данную мышцу. Эффект одиночного импульса Ia афферента достаточно слабый, однако суммарное влияние от афферентов может значительно возрастать благодаря временно́й или пространственной суммации.

Спинальные интернейроны участвуют в рефлексах, которые направлены на координированное движение конечностей. Это свидетельствует о сложных программах, которые закодированы в нейронных сетях спинного мозга. Предназначение сенсорных систем заключается в адаптации двигательных программ к изменяющимся условиям внешней среды. Двигательный аппарат спинного мозга имеет медиальный компонент, контролирующий мышцы туловища и проксимальную группу мышц конечностей. Эти мышцы важны для сохранения осанки, ходьбы и дыхания. Латеральный компонент двигательного контроля отвечает за дистальные мышцы конечностей, которые обеспечивают тонкие произвольные движения.

Двигательная кора организована соматотопически. Корковые нейроны возбуждаются пропорционально *силе* сокращения мышцы или малой группы мышц, контролирующих движение в каждом конкретном суставе. Направление движения закодировано вовлечением определенных нейронов двигательной коры. Сенсомоторная интеграция происходит в ассоциативных зонах коры, таких как премоторная и париетальная кора.

Мозжечок выполняет функцию дополнительного сенсомоторного интегратора. Нарушения функции мозжечка проявляются в потере координации и баланса, хотя и не приводят к заметным изменениям в чувствительной сфере. Базальные ганглии формируют нейронную сеть, отвечающую за механизмы обратной связи. Патология базальных ганглиев проявляется в возникновении спонтанных ошибочных сигналов к мышцам, в ограничении произвольных движений.

Для того, чтобы пиявка или рыба могла плыть, сова или кошка могла поймать мышь, медведь или ребенок мог освоить катание на велосипеде, мышцы должны быть вовлечены в сокращение в правильном порядке, порой очень быстро, причем сокращение должно гармонично чередоваться с расслаблением. Где, в каком отделе мозга принимается решение начать произвольное движение, на сегодняшний день остается еще малоизученным вопросом. Тем не менее ясно, что нейронные механизмы произвольных движений представляют собой важнейшие вопросы нейрофизиологии. В отличие от сенсорной системы, наше понимание организации моторного контроля прогрессирующе уменьшается по мере перехода от периферии к центральным механизмам. Тому есть объективное основание, поскольку к мотонейрону конвергирует огромное число нейронных путей от высших центров. В свою очередь, высшие центры также получают колоссальное число входных сигналов. Так как в процессе изучения этой сложной иерархии мы движемся от периферии к центру, то есть в направлении, обратном естественной сигнализации, мы неизбежно вынуждены либо ограничить число рассматриваемых связей, либо выбрать строго

один специфический путь, что в любом случае приводит к ограниченной информации об устройстве моторного контроля.

Так же как в сенсорной системе, принципы организации стали ясны из довольно простых тестов. Первый принцип заключается в том, что моторный контроль организован иерархически. Наиболее сложные двигательные команды формируются в высших центрах (рис. 22.1). На более низком уровне, в спинном мозге, сенсорные нейроны образуют синапсы с мотонейронами для замыкания простых рефлексов, для которых нет необходимости вовлекать высшие центры. Кроме того, интернейроны спинного мозга и ствола мозга образуют генераторы центрального ритма для координации множественных моторных единиц (отвечающих, например, за локомоцию или дыхание). Над ними есть «надзирающий» контроль со стороны нейронов двигательной коры, мозжечка и базальных ганглиев, которые могут изменить программу низшего уровня или сформировать более сложную двигательную команду.

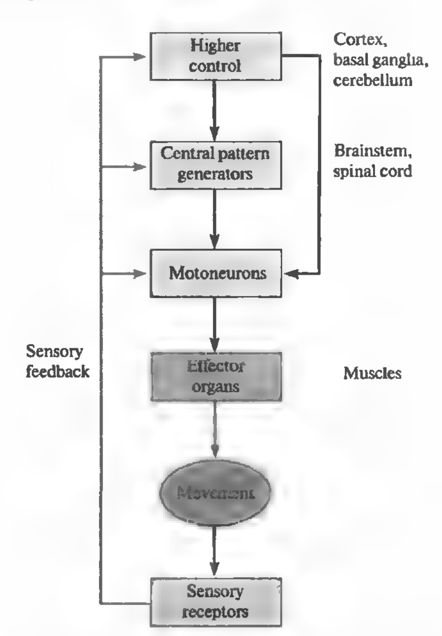


Рис. 22.1. Общая схема организации двигательной системы. Мышцы конечностей контролируются мотонейронами и интернейронами спинного мозга. Интернейроны спинного мозга и ствола мозга формируют генератор центрального ритма, управляющий двигательным аппаратом. Двигательные команды планируются и корректируются моторной корой, базальными ганглиями и мозжечком. На каждом уровне двигательной системы сенсорная импульсация служит для запуска, оповещения о ходе выполнения и модуляции выходных сигналов.

Fig. 22.1. A General Scheme for Motor System Organization. Limb muscles are controlled by motoneurons and interneurons of the spinal motor apparatus. Interneurons within the spinal cord and brainstem make up central pattern generators that direct the motor apparatus. Motor output is planned and refined by the motor cortex, basal ganglia, and cerebellum. At every level of motor control, sensory input serves to initiate, inform, and modulate output.

Второй важный принцип заключается в том, что, за редким исключением, все выходные двигательные команды выверяются и модулируются механизмами обратной связи. Сенсорный контроль происходит на каждом уровне двигательной системы. Для этого используются как положительные, так и отрицательные обратные связи. В частности, для временной организации и координации высших центров в ходе выполнения корковых двигательных команд важными являются петли обратных связей базальных ганглиев и мозжечка.

Наконец, параллельные потоки двигательных команд могут быть правильно организованы соответственно вовлечению проксимальной и дистальной группы мышц. В этом случае кажущееся чисто анатомическим деление на группы приобретает важнейшее функциональное назначение. Мускулатура туловища и проксимальные мышцы конечностей обеспечивают осанку и ритмические акты, такие как локомоция и дыхание. Дистальная группа мышц, особенно управляющая кистями и пальцами, вовлечена в произвольные сложные движения, в том числе базирующиеся на обучении и тренинге. Соответственно этому делению, проксимальная и дистальная группы мышц обеспечиваются отдельными ядрами ствола мозга и раздельными нисходящими нервными путями.

Клеточные механизмы, лежащие в основе спинальных рефлексов, изучены относительно хорошо, и поэтому мы начнем описание двигательных систем именно с рассмотрения свойств спинальных мотонейронов и синаптической организации связанных с ними рефлексов. Следующим шагом будет освещение вопроса об организации нейронных сетей, лежащих в основе ритмических координированных движений, таких как локомоция и дыхание. Затем мы перейдем к вопросу о функции двигательной коры, базальных ганглиев и мозжечка.

§ 1. Двигательная единица

Шеррингтон считал мотонейроны спинного мозга **«общим конечным путем»**, поскольку все нервные импульсы, имеющие отношение к движению или сохранению позы, обязательно конвергируют на мотонейроне. Основной мотонейрон спинного мозга называется α-мотонейрон (мотонейроны малого размера, которые контролируют функцию мышечных веретен, называются γ-мотонейроны и будут рассмотрены позже). Одиночный α-мотонейрон, иннервирующий группу мышечных волокон, вместе с этими мышечными волокнами образуют **моторную (или двигательную) единицу**. Число мышечных волокон в двигательной единице варьирует от всего нескольких волокон, например в мышце, управляющей движением пальцев, до нескольких тысяч, как это представлено в проксимальных мышцах конечностей.

Возбуждение двигательной единицы приводит к одновременному сокращению всех мышечных волокон, входящих в нее. Таким образом, двигательная единица образует элементарный компонент двигательного акта мышцы. Плавность и точность движения обеспечивается вариацией числа и времени вовлечения отдельных двигательных единиц[1]. Участие отдельных двигательных единиц в общем сокращении мышцы не всегда очевидно, так как есть асинхронность их участия и эластичность самой мышечной ткани, что приводит к эффекту сглаживания. Например, 25 000 мышечных волокон в камбаловидной мышце кошки обеспечиваются 100 α-мотонейронами. Одиночное сокращение такой мышцы, таким образом, может быть разделено на 100 элементарных шагов, обеспечиваемых сокращением отдельных двигательных единиц. Продленное сокращение (тетанус), основанное на повторной активации двигательных единиц, может быть организовано еще более тонко. Это связано с тем, что каждый мотонейрон может генерировать свою собственную частоту потенциалов действия, что в свою очередь будет проявляться разной формой суммации мышечных волокон, входящих в состав этой двигательной единицы.

Синаптические входы на мотонейрон

Вовлечение и тонкий контроль мотонейронов, направленные на формирование координированных движений, требуют, чтобы множественные команды, поступающие к мотонейрону, были организованы в определенной последовательности и были правильно сбалансированы. Поэтому не удивительно, что мотонейрон в среднем имеет до нескольких тысяч синаптических входов[2] (рис. 1.13А в главе 1). Эти синаптические входы передают команды от высших двигательных центров и снабжают мотонейрон сенсорной информацией разной модальности, поступающей с периферии. Поступающие импульсы вызывают возбуждающие и тормозные постсинаптические потенциалы (ВПСП и ТПСП). Пресинаптическое ингибирование селективно регулирует эффективность поступающих сигналов. Если мотонейрон деполяризован до некоего критического уровня, то в специализированной зоне, в **аксонном холмике**, генерируется потенциал действия, направляемый к периферии.

Благодаря активным исследования в этой области, прежде всего работам Ллойда[3], а также Экклса с коллегами[1], достигнут существенный прогресс в понимании синаптической передачи в мотонейронах и в механизмах взаимодействия между ВПСП и ТПСП. Важнейший синаптический вход передает информацию, поступающую с мышечных веретен (глава 17). Афференты группы Ia образуют моносинаптические возбуждающие входы на мотонейроне. В скрупулезных отведениях от всех мотонейронов, иннервирующих определенную мышцу (так называемый **моторный пул**), Мендел и Хенман[4] показали, что одиночный Ia афферент посылает сигналы к 300 мотонейронам, то есть практически ко всем мотонейронам, иннервирующим данную мышцу. В некоторых больших мышцах аксоны формируют небольшие ответвления для иннервации определенных групп мышечных волокон. В этой ситуации сенсорные волокна Ia афферентов от этого участка мышцы образуют синаптические контакты преимущественно с соответствующими мотонейронами.

Синаптические контакты отдельного Ia афферента могут быть прямо продемонстрированы с помощью внутриклеточной инъекции фермента пероксидазы хрена (ПХ). Аксоны меченного ПХ Ia афферента интенсивно разветвляются в спинном мозге, образуя множественные контакты с мотонейронами (рис. 22.2). Более детальное исследование афферентов с использованием ПХ позволяет идентифицировать точные места контакта сенсорных окончаний с мотонейроном (рис. 22.2В). Конвергенция афферентов к мотонейрону приводит к образованию от двух

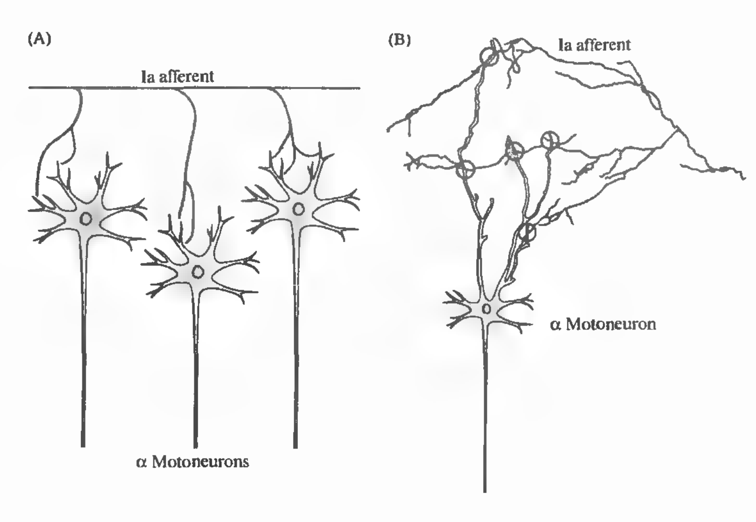


Рис. 22.2. Синаптические контакты между афферентами рецепторов растяжения и спинальными мотонейронами. (A) Ia афферент от одиночного мышечного волокна посылает отростки к нескольким мотонейронам. (B) Более детализированная картина, показывающая первичный афферент, проходящий через множественные разветвления дендрита, с указанием предположительных синаптических контактов (показаны кружками). Картина иннервации такого рода может быть получена путем мечения афферентов или мотонейронов с помощью пероксидазы хрена.

Fig. 22.2. The Contacts between Stretch Receptor Afferents and Spinal Motoneurons. (A) A single muscle spindle fiber (Ia) afferent sends branches to several motoneurons. (B) More detailed view shows the afferent fiber passing over multiple dendritic branches, indicating possible points of synaptic contact (circles). Innervation patterns of this kind can be seen experimentally by labeling afferent fibers and motoneurons with histological markers such as horseradish peroxidase (HRP). (After Burke and Glenn, 1996.)

до пяти синаптических контактов на дендритном дереве[6]. Все контакты Ia афферента локализуются в определенном районе дендритного дерева, хотя не обязательно на одинаковом расстоянии от сомы[7]. Все эти контакты представляют собой разветвления одного аксона, тогда как другие ветви того же аксона проходят дальше, для иннервации другого мотонейрона.

Одиночные синаптические потенциалы мотонейронов

Импульс, приходящий по одиночному волокну Ia афферента приводит к генерации в мотонейроне только небольшого моносинаптического возбуждающего потенциала, соответствующего, в среднем, выделению одного или двух квантов трансмиттера. Общее число контактов одиночного волокна достигает 7. Это означает, что на нервный импульс не каждый синаптический бутон освобождает квант медиатора. Детальные количественные оценки этих событий были впервые представлены Куно[8], который рассекал тонкие пучки сенсорных волокон в дорзальных корешках и регистрировал потенциалы, вызванные стимуляцией одиночных Ia афферентных волокон.

Другой способ оценки вклада отдельных входов на мотонейрон заключается в усреднении потенциалов, возникающих в мотонейроне в результате активации одиночного мышечного рецептора[9, 10]. Схема такого эксперимента представлена на рис. 22.3. Сенсорные импульсы, приходящие по одиночному Ia волокну, отводились в дорзальном корешке и использовались для запуска усредняющего устройства, которое суммировало потенциалы, генерируемые в мотонейроне после каждого входного сигнала. Суммация позволяла получить типичную картину разряда нескольких сотен импульсов.

ВПСП, возникший в теле мотонейрона в результате активации одиночного Ia афферента имел амплитуду около 200 мкВ. Хотя такой небольшой сигнал не мог оказать существенного влияния на функцию мотонейрона, но их суммация во время залповой активности или суммация нескольких входов могла оказать весьма существенный эффект (рис. 22.4). При высокочастотной активации Ia афферента происходит **временная суммация** ВПСП, приводящая к резкому возрастанию суммарной деполяризации. Кроме того, стоит

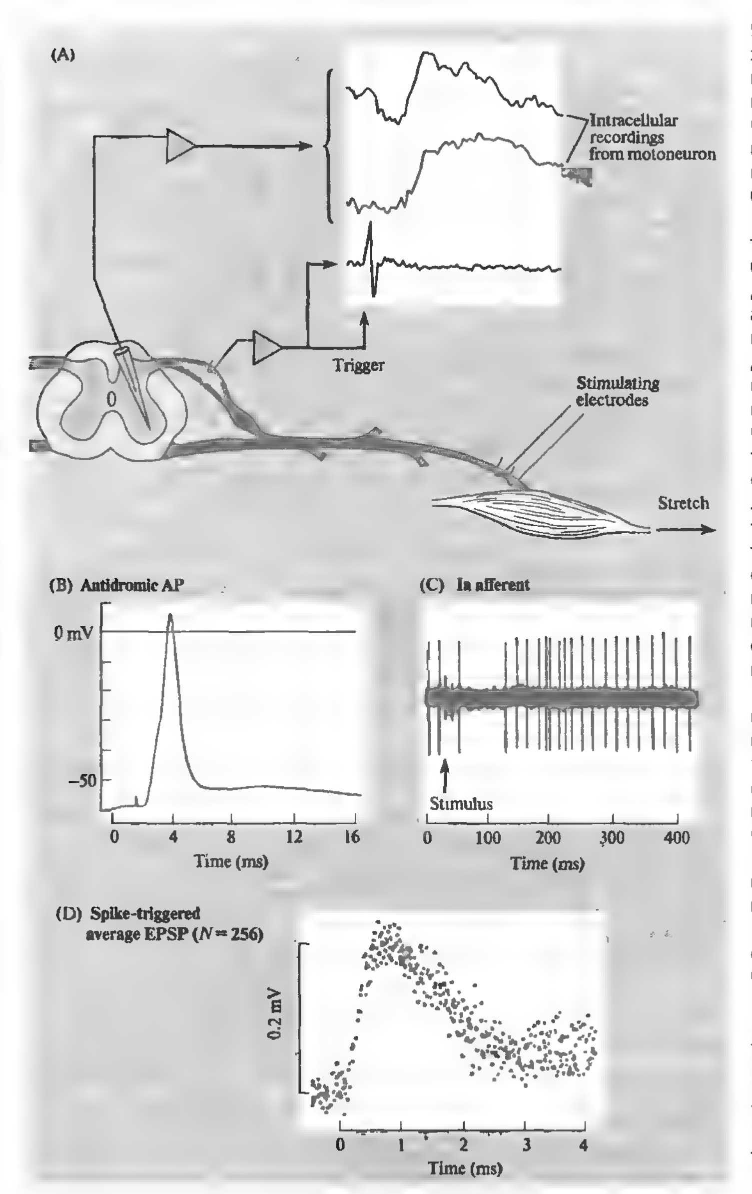


Рис. 22.3. Усреднение возбуждающих постсинаптических потенциалов. (A) Принцип получения усредненного изображения: импульс от одиночного рецептора растяжения в дорзальных корешках был использован для запуска пробега осциллографа. Внутриклеточный микроэлектрод был использован для отведения мембранного потенциала спинального мотонейрона. На осциллограмме виден входящий сенсорный импульс (самый нижний пробег) и два последовательных возбуждающих потенциала, которые трудно оценить количественно из-за колебаний изолинии. (B) Стимуляция двигательного нерва вызывает антидромный потенциал действия (AP), обнаруживаемый при внутриклеточном отведении, что позволяет идентифицировать клетку как мотонейрон. (C) Внеклеточное отведение разряда одиночного волокна в дорзальных корешках. Разряд наблюдался при растяжении мышцы и прекращался при сокращении мышцы. Это свидетельствует о том, что данное волокно относится к Ia афферентам мышечных веретен (глава 17). (D) Усредненные ВПСП, зарегистрированные так же, как на (A). После усреднения многих пробегов потенциалы, не связанные с сенсорными импульсами, нивелируются и остаются только вызванные ВПСП.

Fig. 22.3. Averaging of Excitatory Postsynaptic Potentials. (A) Scheme for averaging: The impulse from a single stretch receptor recorded in a dorsal root filament is used to trigger the sweep of an oscilloscope. An intracellular microelectrode records the membrane potential of a spinal motoneuron. The oscilloscope records show the incoming sensory impulse (lowest trace) and two successive sweeps of excitatory potentials that are difficult to quantify because of unrelated fluctuations in the baseline. (B) Stimulation of the muscle nerve evokes an antidromic action potential (AP) in the intracellular record, identifying the cell as a motoneuron. (C) Extracellular recording of a single-fiber discharge in the dorsal root filament. Discharge is produced when the muscle is stretched and pauses when a muscle contraction is evoked by stimulation. This identifies the fiber as a Ia afferent from a muscle spindle (Chapter 17). (D) Averaged EPSPs recorded as in (A). When a large number of sweeps are averaged, potentials not time-locked to the sensory impulse cancel out, leaving only the average evoked EPSP. This record shows the digitized average of 256 such events. (After Hilaire, Nicholls, and Sears, 1983.)

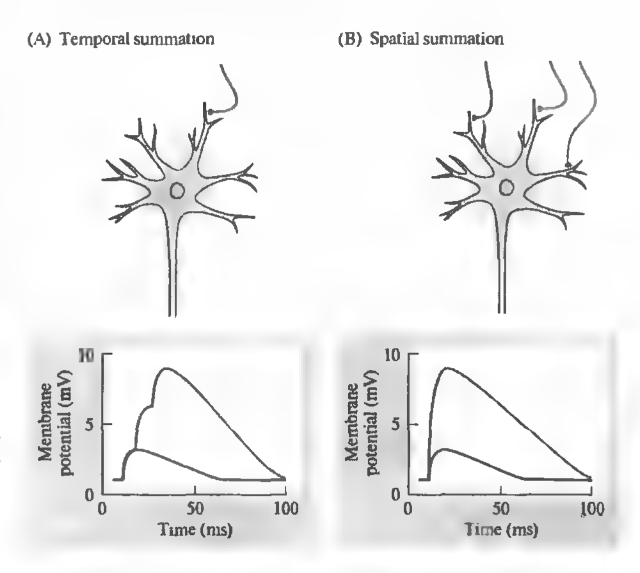


Рис. 22.4. Временная и пространственная суммация. (A) потенциал действия в одиночном Ia афференте продуцирует синаптический потенциал в мотонейроне с амплитудой менее 1 мВ. Когда по афферентам проходит залп импульсов, последующие ВПСП возникают на фазе спада от предыдущего, увеличивая суммарную деполяризацию, что называется временной суммацией. (B) Мышца, такая как m. soleus кошки, может иметь до 100 мышечных веретен и такое же количество Ia афферентов. Все они дивергируют в спинном мозге, контактируя с большинством мотонейронов в моторном ядре. В результате на каждом мотонейроне конвергирует до 100 Ia афферентов. Сильное растяжение мышцы, способное активировать большинство Ia аффрентов, вызывает одновременную генерацию множества одиночных ВПСП, приводя к значительной деполяризации в результате пространственной суммации.

Fig. 22.4. Temporal and Spatial Summation. (A) An action potential in a single Ia afferent produces a synaptic potential in a motoneuron that is only a fraction of a millivolt. When the afferent fires at a higher frequency, the successive EPSPs ride on the falling phase of the previous one, so they build up to a larger depolarization—temporal summation. (B) A muscle, such as the soleus in a cat, may have as many as 100 muscle spindles, and so an equivalent number of Ia afferent fibers. These all diverge to contact the majority of motoneurons in the motor pool. Thus, 100 Ia afferents converge onto each motoneuron. A strong stretch of the muscle is likely to activate all Ia afferents, so their individual EPSPs add to depolarize the motoneuron by spatial summation.

учесть, что сильное растяжение мышцы, такой как m. soleus способно привести к активации всех 50 рецепторов растяжения. Поскольку каждый Ia афферент дивергирует ко всем нейронам моторного пула, каждый мотонейрон, соответственно, получает импульсацию от всех 50 афферентов. Такая **пространственная суммация** всех синаптических входов может приводить к возбуждению мотонейрона (рис. 22.4B). Поскольку в мотонейроне может возникнуть и торможение, интеграция возбуждающих и тормозных постсинаптических потенциалов будет определять, приведет ли приходящая активность к достижению порога и генерации потенциала действия или нет.

Принцип размера и градуальное сокращение

Как организована активность мотонейрона, в результате которой возникают плавные движения конечностей? Как указывалось ранее, сила мышечных сокращений может быть увеличена вовлечением дополнительных мотонейронов или усилением частоты их активации. Однако следует уточнить, что это вовлечение мотонейронов определенным образом связано с их размерами. Мотонейроны малого размера с тонкими аксонами иннервируют небольшое число мышечных волокон. Поэтому их вовлечение слабо скажется на результирующем сокращении. Мотонейроны большого размера с толстыми аксонами контактируют с большим числом мышечных волокон. Поэтому нервный импульс, проходящий по такому аксону, приводит к сильному мышечному сокращению. Во время сокращения первоначально активируются малые нейроны, приводя к плавному началу сокращения. Затем вовлекаются крупные мотонейроны, что проявляется в значительном усилении сокращения[11]. Таким образом, за счет вовлечения малых и крупных мотонейронов достигается плавность и градуальность сокращения. Последовательное включение мотонейронов разного размера известно как **принцип размера (size principle)**.

Максимальное сокращение, основанное на вовлечении всех моторных единиц, достигает более 3,5 кг. Ясно, что участие мелких нейронов мало скажется тогда, когда максимальное сокращение уже достигнуто. С другой стороны, редкая активация крупных мотонейронов может нарушить плавность движений, упра-

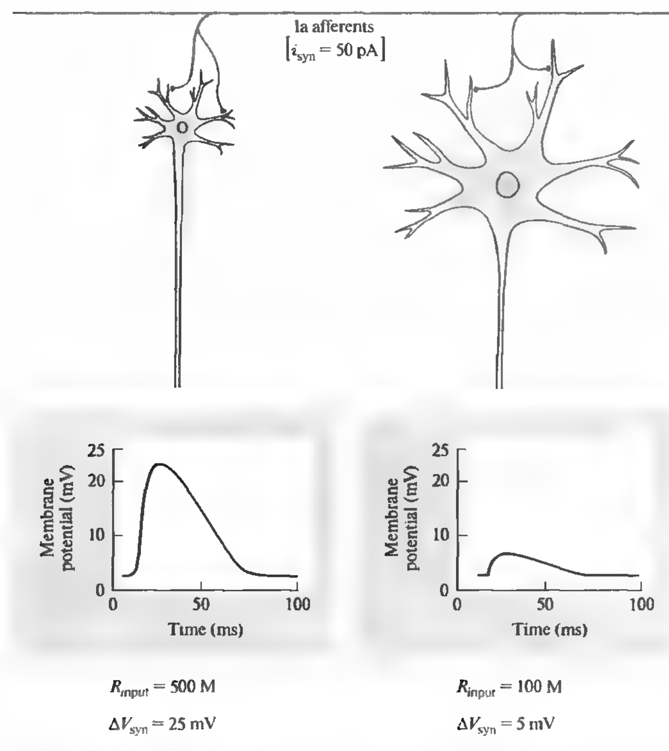


Рис. 22.5. Принцип клеточного размера. Ток, протекающий через клетку, производит изменения мембранного потенциала, которые пропорциональны входному сопротивлению клетки (r_{input}). Входное сопротивление обратно пропорционально радиусу клетки, поэтому один и тот же синаптический ток (i_{syn}) вызовет у малых мотонейронов большую деполяризацию ($\Delta V_{syn} = i_{syn} r_{input}$). В данном случае Ia афферент снабжает одинаковым числом синаптических контактов два мотонейрона в одном из моторных ядер. Тот же синаптический ток (50 пА) производит гораздо больший эффект в малых мотонейронах.

Fig. 22.5. The Size Principle. Current flow into a cell produces a change in membrane potential that is proportional to the input resistance (r_{input}). Input resistance is inversely proportional to the radius of the cell, so equivalent synaptic currents (i_{syn}) produce greater depolarization ($\Delta V_{syn} = i_{syn} r_{input}$) of smaller motoneurons. Here Ia spindle afferent input is provided equally to two members of the motor pool (representing the spatial summation of a large number of spindle afferents innervating the muscle). The same synaptic current (50 pA) produces a greater effect in the smaller motoneuron.

вляемых мелкими мотонейронами. Тот факт, что мотонейроны вовлекаются в сокращение согласно их размеру, приводит к тому, что участие каждой последующей двигательной единицы добавляет около 5 % к текущему мышечному усилию. Например, при активации мелкого мотонейрона, управляющего m. soleus кошки, эта мышца развивает усилие величиной 5 г, а при активации крупного мотонейрона — более 100 г.

Тот факт, что вовлечение очередной моторной единицы добавляет к текущему напряжению определенную фиксированную фракцию, находит проявление и в сенсорных аспектах моторной активности. Например, мы судим о весе предметов по мышечной силе, необходимой для их удержания. При этом мы можем различить предметы весом 2 и 3 г, но не заметим разницы между предметами весом 2002 и 2003 г. То, что важно *относительное* изменение, наиболее ясно сформулировано в принципе Вебера—Фехнера (глава 17).

Могут ли клеточные свойства мотонейронов объяснить принцип размера? Представьте, что все мотонейроны, иннервирующие мышцу, получают один и тот же синаптический вход. Падение напряжения, продуцированное синаптическим током в отдельном мотонейроне, зависит от входного сопротивления, которое, в свою очередь, является функцией размера клетки (рис. 22.5). Как показано в главе 7, входное сопротивление обратно пропорционально радиусу клетки. Поэтому один и тот же входной сигнал вызовет гораздо большее падение напряжение в нейронах малого размера, что более вероятно вызовет в них генерацию потенциала действия, чем в крупных нейронах. По мере увеличения сенсорного притока нейроны все более крупного размера будут генериро-

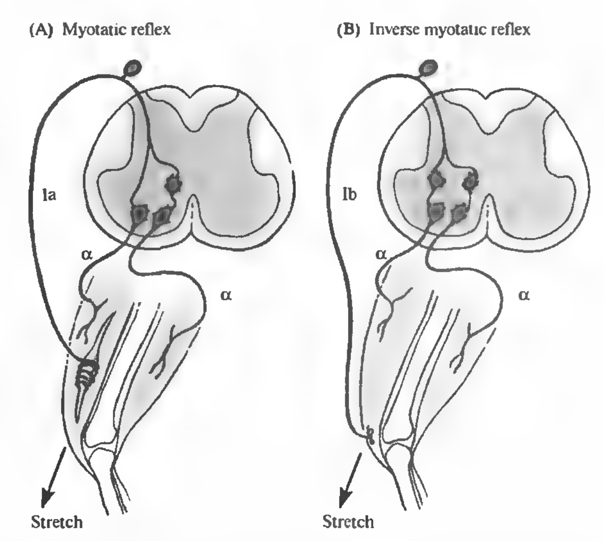


Рис. 22.6. Организация синаптических контактов для рефлексов спинного мозга. Спинной мозг показан в поперечном сечении, с указанием интернейронов. (A) При миотатическом рефлексе растяжение мышечных веретен генерирует импульсы, которые проходят по Ia афферентным волокнам в спинной мозг и вызывают моносинаптическое возбуждение в α-мотонейронах той же мышцы. Импульсы возбуждают также интернейроны, которые, в свою очередь, ингибируют мотонейроны, снабжающие мышцы-антагонисты. (B) Активация сухожильных органов Гольджи вызывает импульсацию в Ib афферентах, которые, через интернейроны, обеспечивают торможение мотонейронов этой мышцы и одновременно возбуждают мотонейроны мышц-антагонистов.

Fig. 22.6. Organization of Synaptic Connections for reflex actions in the spinal cord. The spinal cord is shown in transverse section, with inhibitory interneurons in black. (A) In the myotatic reflex, stretch of the muscle spindle generates impulses that travel along group Ia afferent fibers to the spinal cord and produce monosynaptic excitation of α-motoneurons to that same muscle. Impulses also excite interneurons that, in turn, inhibit motoneurons supplying the antagonist muscles. (B) Activation of Golgi tendon organs produces impulses in group Ib afferent fibers that, through interneuronal connections, provide inhibition to motoneurons supplying the same muscle and excitation to antagonist motoneurons. (This is sometimes called the inverse myotatic reflex.)

вать потенциал действия. Принцип размера справедлив для всех синаптических контактов, поскольку они равномерно распределены среди мотонейронов[12)—14)].

§ 2. Спинальные рефлексы

Реципрокная иннервация

Движение конечностей обусловлено координированным сокращением работающих вместе мышц, называемых **агонистами**. В это же время мышцы противоположного функционального назначения, называемые **антагонисты**, находятся в состоянии расслабления. **Мышцы-удлинители** конечностей разгибают или удлиняют суставы, что помогает преодолеть силы притяжения, **мышцы-сгибатели** сгибают суставы и притягивают конечности к телу. При активации **миотатического рефлекса** растяжением мышцы, например при ударе по коленной чашечке, первичные сенсорные окончания в мышечных веретенах мышц-удлинителей (четырехглавой мышце бедра) подвергаются деформации и инициируют поток импульсов в Ia афферентах, направляющихся в спинной мозг. Эти импульсы продуцируют моносинаптическое возбуждение в α-мотонейронах, посылающих сигналы обратно к растянутой мышце, что, в конечном счете, приводит к ее рефлекторному сокращению. Сокращение мышцы-удлинителя сопровождается одновременным торможением α-мотонейрона, который иннервирует антагонистическую мышцу-сгибатель. Это происходит потому, что Ia афференты активируют также интернейроны, которые, в свою очередь, ингибируют α-мотонейроны антагонистов (рис. 22.6A). Принцип, когда активация одной группы мышц сопровождается торможением антагонистов, был впервые описан Шеррингтоном, который назвал его **реципрокной иннервацией**.

Для простоты, на рис. 22.6A не показаны некоторые проводящие пути. Например, импульсы от небольшой группы II афферентов усиливают рефлексы как напрямую через моносинаптические контакты, так и посредством подключения интернейронов[15)]. Эти внутриспинальные переключения были описаны в деталях[16)—18)]. Ингибиторные интернейроны активируются также сухожильными органами Гольджи (СОГ), чувствительные окончания которых инкапсулированы на месте соединений мышцы и сухожилия (рис. 22.6B). Их афферентные волокна обо-

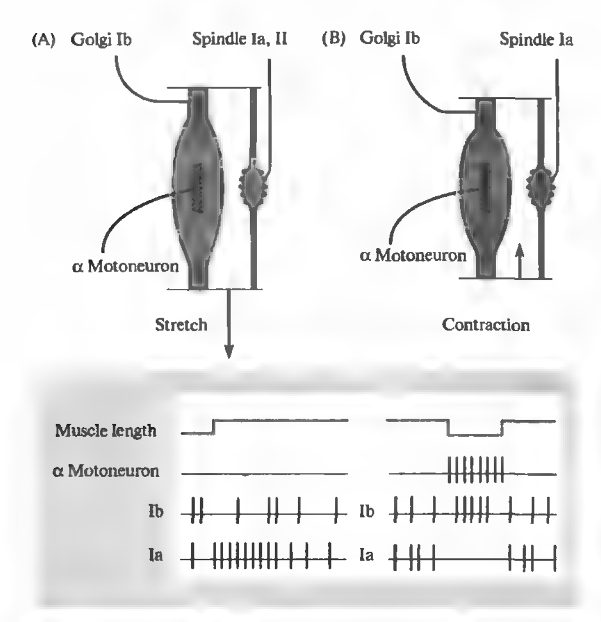


Рис. 22.7. Отслеживание мышечного сокращения. (А) Во время внешнего растяжения экстрафузальных мышечных волокон Ia афференты реагируют на него благодаря своему параллельному расположению. В отличие от этого, Ib афференты сухожильных органов Гольджи отвечают очень слабо либо не отвечают вообще, благодаря их последовательному расположению и присущей мышцам эластичности. (В) Во время активации α-мотонейронов экстрафузальные волокна сокращаются, что приводит к возбуждению Ib афферентов сухожильных органов Гольджи, тогда как мышечные веретена не реагируют, поскольку растяжение интрафузальных волокон нейтрализовано укорочением мышцы.

Fig. 22.7. Sensing Muscle Contraction. (A) During an imposed stretch of the extrafusal muscle, the spindle's Ia afferent senses the imposed stretch directly because of its "parallel" arrangement. However, the Golgi tendon organ Ib afferents respond only slightly or not at all, because of their "serial" position and the inherent elasticity of muscle. (B) During activation of the α-motoneurons, the extrafusal muscle contracts and the Golgi tendon organ's Ib afferents are excited, but the spindle afferents quiet as the stretch of the intrafusal fibers is relieved by shortening of the muscle.

значаются как Ib, для того чтобы отличать их от афферентных волокон мышечных веретен. СОГ располагаются последовательно относительно сокращающихся мышечных волокон. Поэтому СОГ можно активировать пассивным растяжением мышцы, но адекватным раздражителем является мышечное сокращение. Достаточно сокращения всего одного или двух мышечных волокон, развивающих усилие меньше 100 мг, для того, чтобы вызвать ощутимый разряд в Ib афферентах[19, 20]. Эти волокна от СОГ активируют интернейроны, которые, в свою очередь, тормозят мотонейроны, иннервирующие мышцу, в которой были активированы Ib афференты[21] (рис. 22.6В). Информация, получаемая от СОГ, позволяет выработать адекватную двигательную команду, которая передается в высшие моторные центры[22].

Сенсорная информация от мышечных рецепторов

СОГ и мышечные веретена производят противоположный эффект на мотонейроны той мышцы, в которой они располагаются. Активность мышечных веретен возбуждает мотонейрон, тогда как СОГ через интернейроны оказывают тормозящее действие на мотонейроны. Различное расположение этих двух рецепторов обеспечивает не только быстрые рефлекторные реакции, но и снабжает мозг важной информацией о положении конечностей и силе мышечного сокращения (рис. 22.7). Как уже отмечалось ранее, за счет последовательного расположения СОГ относительно мышечного волокна они активируются при сокращении и слабо реагируют на внешние стимулы. Наоборот, мышечные веретена располагаются параллельно экстрафузальным мышечным волокнам и их активность снижается при мышечном сокращении. Мышечные веретена высоко чувствительны и к пассивному растяжению. В результате мышечные веретена служат как датчики длины, тогда как СОГ контролируют силу мышечных сокращений. Поскольку информация от той и другой афферентной систем направляется к высшим центрам, анализ этой сигнализации позволяет осуществлять тонкую регулировку мышечных сокращений.

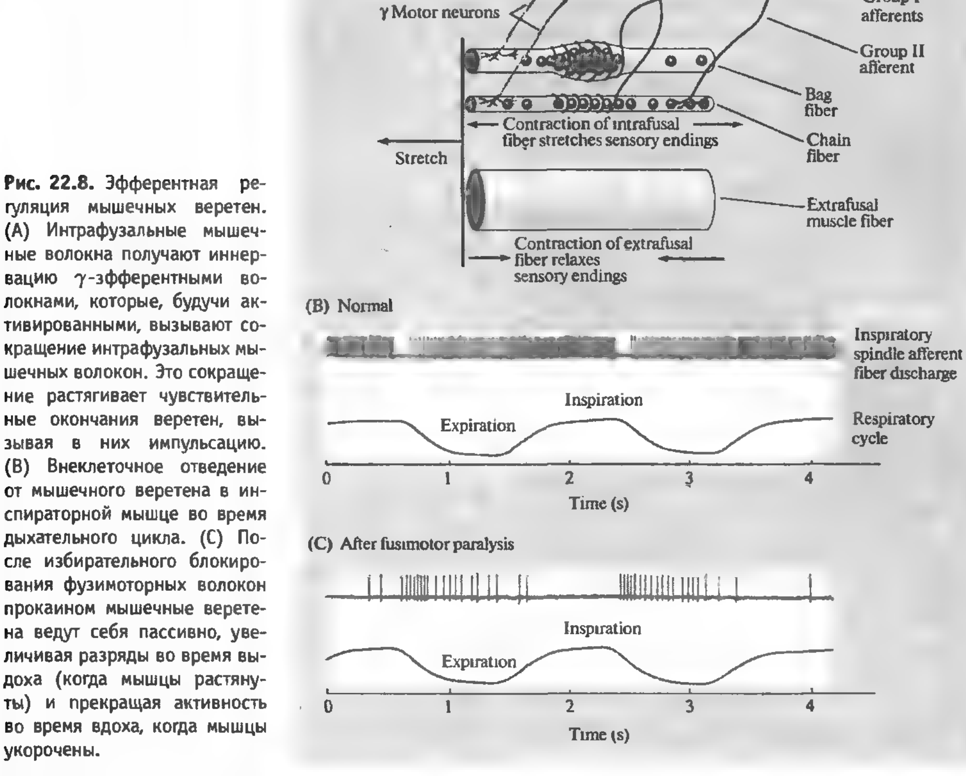


Рис. 22.8. Эфферентная регуляция мышечных веретен. (A) Интрафузальные мышечные волокна получают иннервацию γ-эфферентными волокнами, которые, будучи активированными, вызывают сокращение интрафузальных мышечных волокон. Это сокращение растягивает чувствительные окончания веретен, вызывая в них импульсацию. (B) Внеклеточное отведение от мышечного веретена в инспираторной мышце во время дыхательного цикла. (C) После избирательного блокирования фузимоторных волокон прокаином мышечные веретена ведут себя пассивно, увеличивая разряды во время выдоха (когда мышцы растянуты) и прекращая активность во время вдоха, когда мышцы укорочены.

Fig. 22.8. Efferent Regulation of Muscle Spindles. (A) Intrafusal muscle fibers of mammalian spindles receive innervation by γ efferent fibers that, when activated, cause the intrafusal fibers to contract. This contraction distorts the sensitive endings of the spindle afferents, causing them to fire. The mass of extrafusal muscle fibers is drawn separately; when it contracts, stretch on the intrafusal fibers is reduced. (B) Extracellular recording from a muscle spindle in an inspiratory muscle during the respiratory cycle (lower trace). Normally the sensory discharge from inspiratory muscle spindles is highest during inspiration, even though the muscles are shortening. This is due to simultaneous activation of γ efferents to the spindle. (C) After the fusimotor fibers are blocked selectively by procaine, the spindles behave passively, with increased discharges during expiration, when the muscles are stretched, and cessation of activity on inspiration, when the muscles are shortened. (After Critchlow and von Euler, 1963.)

Эфферентный контроль мышечных веретен

Ответ от мышечных веретен осложнен тем, что веретена имеют собственные сократительные элементы, так называемые интрафузальные мышечные волокна (глава 17). Они по ряду признаков отличаются от экстрафузальных волокон, которые образуют рабочую мышцу[23]. Так, они сокращаются в ответ на возбуждение, приходящее от небольших (диаметр 2–8 мкм) γ-мотонейронов по **фузимоторным волокнам** (рис. 22.8A). Фузимоторные волокна впервые были описаны Экклсом и Шеррингтоном[24] и изучены в деталях Лекселлом[25].

Роль фузимоторных волокон была окончательно установлена в серии технически сложных экспериментов, проведенных Куффлером с соавторами[26]. Суть этих экспериментов заключалась в регистрации активности отдельных афферентных Ia волокон дорзальных корешков, приходящих от мышечного веретена в ответ на стимуляцию фузимоторного волокна вентральных корешков, иннервирующего это же веретено. Стимуляция фузиморного волокна приводила к усилению сенсорной активности, но не меняла мышечное на-

пряжение. Залпы импульсов в фузимоторном нейроне усиливали сенсорную импульсацию, если мышца была растянута, или инициировали сенсорный поток в сократившейся мышце. Сенсорная импульсация возникала потому, что активация фузимоторного нейрона приводила к сокращению интрафузального мышечного волокна, что растягивало и активировало окончания рецепторов растяжения I и II типа.

Роль γ-мотонейронов в регуляции импульсации мышечных веретен заключается в следующем: без γ-мотонейронального контроля рецепторы растяжения во время мышечного укорочения были бы неактивными и неспособными отслеживать изменения длины мышц. Поэтому во время сокращения экстрафузальных мышечных волокон, активируемых α-мотонейронами, параллельно происходит активация γ-мотонейронов и, соответственно, сокращение интрафузальных волокон. За счет этого фузимоторная система поддерживает чувствительность рецепторов мышечных веретен при любом объеме движений конечностей. Таким образом, фузимоторная иннервация мышечных веретен может рассматриваться как своеобразный «регулятор усиления», постоянно подстраивающий чувствительность датчиков к изменяющимся условиям функционирования.

Экспериментальные свидетельства совместной активации α- и γ-мотонейронов были получены в опытах[27)—29)], в которых отводились разряды мышечных веретен в инспираторных мышцах во время дыхательных движений. Рис. 22.8B показывает, что афферентный разряд в рецепторах растяжения инспираторных мышц, действительно, наиболее выражен во время вдоха, когда эти мышцы максимально укорочены. Это может получить объяснение, если допустить, что α- и γ-мотонейроны совместно активированы, так что сокращение интрафузальных волокон компенсирует и даже превышает укорочение экстрафузальных. Если же γ-мотонейроны блокированы местным анестетиком (рис. 22.8C), афферентные волокна возбуждаются только во время выдоха, который приводит к растяжению инспираторных мышц. Другое доказательство **ко-активации** α- и γ-мотонейронов было получено на модели движения пальца, когда разряды в мышечных афферентах отводились во время произвольных изометрических сокращений, не сопровождаемых движениями в суставах[30)].

Достаточно ясно, что наличие собственной иннервации мышечных веретен осложняет их функцию как простых датчиков длины мышцы (рис. 22.8). Разряды мышечных афферентов растянутых мышц без фузимоторного контроля могут быть такими же, как от укороченных мышц с активным участием фузимоторных волокон. Поэтому электрическая активность веретен сама по себе не может быть абсолютным индикатором длины мышцы. Для вычисления этой информации «в чистом виде» необходимо вносить поправку на активность фузимоторных влияний.

Сгибательные рефлексы

Активация болевых рецепторов кожи может приводить к сложным движениям, вовлекающим не только несколько суставов, а, порой, и более чем одну конечность. Простейшая форма такой активности называется **сгибательным рефлексом**, поскольку она включает активацию мышц-сгибателей и торможение разгибателей, что в результате приводит к удалению данной конечности от источника раздражения. Точный характер ответа зависит от локализации раздражения и типа вовлеченных болевых и тактильных рецепторов[31)]. Ответная реакция приводит к активации целой нейрональной сети, включающей возбуждающие и тормозные интернейроны (рис. 22.9). Результирующее направление движения зависит от взаимодействия между степенью активации мотонейронов сгибателей и торможения мотонейронов разгибателей. Одновременно с этим активируются разгибатели с контралатеральной стороны, что балансируется ингибированием сгибателей. Такой перекрестно-разгибательный рефлекс является адекватной реакцией, когда мы, например, наступаем на острый гвоздь. Он демонстрирует высокую комплексность координации движений на уровне спинного мозга.

§ 3. Генерация координированных движений

До настоящего момента мы говорили об относительно простых двигательных рефлексах, базирующихся на прямом возбуждении моторных единиц сигналом, приходящим от рецепторов растяжения в самой мышце, причем этот же сигнал, через интернейрон, инги-

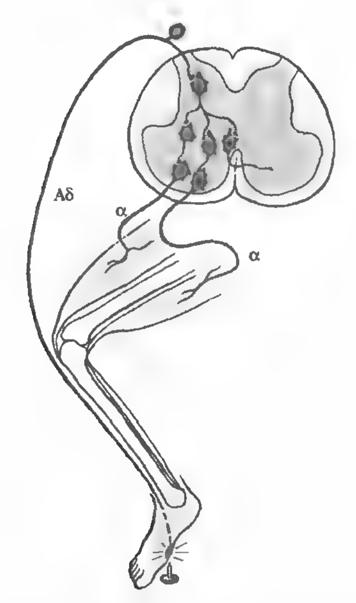


Рис. 22.9. Сгибательный рефлекс, относящийся к защитным, вызван в данном случае наступанием на гвоздь. Возбуждение болевых Aδ-волокон приводит к поднятию бедра и сгибанию колена благодаря полисинаптическому возбуждению мотонейронов сгибателей и торможению мышц-удлинителей конечностей.

Fig. 22.9. The Flexor Reflex is a limb-withdrawal reflex, produced in this example by stepping on a tack. Excitation of Aδ pain fibers results in elevation of the thigh (synaptic connections not shown) and flexing of the knee joint by polysynaptic excitation of flexor motoneurons and inhibition of extensors (black interneurons are inhibitory). Also not shown are contralateral connections that subserve extension of the opposite leg for support.

бирует активность мышц-антагонистов. Интересно выяснить, базируется ли на тех же принципах реципрокной иннервации переменная активация сгибателей и разгибателей при повторяющихся, ритмических движениях, таких как ходьба или дыхание? Скорее всего, это действительно так, поскольку такие движения сопровождаются реципрокной активацией и торможением мышц-антагонистов. Однако есть одно важное отличие, заключающееся в том, что если даже подобные (а может, и те же самые) интернейроны используются для простого рефлекса и ритмической двигательной активности, сенсорная обратная связь не является обязательной для движения. Ритмические паттерны двигательной активности могут регистрироваться даже в изолированной нервной системе как позвоночных, так и беспозвоночных[32].

Генераторы центрального ритма

Если ритмические разряды двигательной активности не связаны с сенсорным притоком, какие же клеточные механизмы могут генерировать командные сигналы на выходе? Предполагается, что это происходит благодаря двум механизмам: (1) ритмическим изменениям возбудимости одиночных нейронов, называемых водителями ритма (**пейсмекерные клетки**); (2) синаптическому взаимодействию нервных клеток в нейрональной сети. Вполне возможно, что эти механизмы работают вместе, производя разные паттерны ритмической активности в нервной системе.

Ритмическая активность в пейсмекерных нейронах возникает благодаря осцилляциям мембранного потенциала. Такие осцилляции могут запускаться различными ионными механизмами, но наиболее часто они базируются на обратной связи между входом кальция в клетку и открытием кальций-активируемых калиевых ионных каналов[33]. Калиевые ионные каналы важны для регуляции временного хода и паттерна ритмической активности в нейронах. Например, особый вид калиевых каналов был найден в генерирующих ритмическую активность нейронах омара[34]. Пейсмекерные нейроны были найдены как у позвоночных, так и у беспозвоночных, включая такие нейроны, которые отвечают за циркадные ритмы в сетчатке улитки, следующие с периодом в 24 часа[35] (см главу 15). Эксперименты, проведенные на изолированном спинном мозге, показали наличие интернейронов-генераторов ритма, имеющие характеристики, сходные с паттерном локомоции[36)—39)].

Достаточно ясно, что нейроны-водители ритма могут передать возбуждение непосредственно другим нейронам, включенным в сеть, например мотонейронам. Для обеспечения переключающегося возбуждения сгибателей и разгибателей требуется уже более сложная нейрональная сеть. Это может быть достигнуто по механизму, показанному на рис. 22.10, когда два идентичных пейсмекера (1 и 2) возбуждают, соответственно, мотонейрон сгибателя и разгибателя. Они же имеют тормозное влияние друг на друга, реализуемое через интернейроны. Благодаря взаимному торможению ни один из агонистов не может быть активным тогда, когда активен его антагонист. Таким образом, тормозные взаимодействия обеспечивают реципрокность функционирования групп нейронов. Генерация цен-

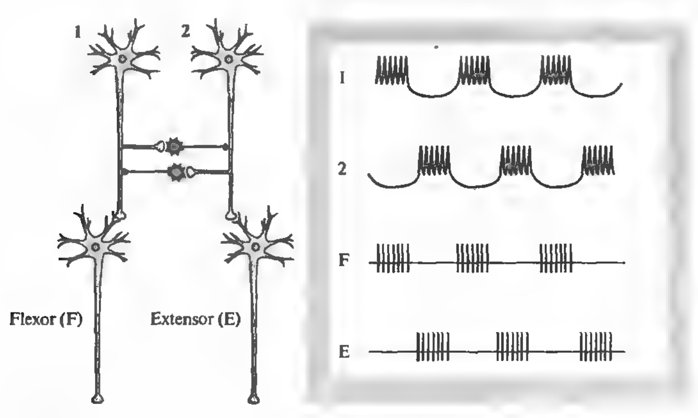


Рис. 22.10. Гипотетический генератор ритма, состоящий из двух пейсмекерных клеток (1 и 2), которые возбуждают сгибатели и разгибатели, соответственно. Пейсмекерные клетки генерируют спонтанный ритм и сопряжены с тормозными интернейронами, которые обеспечивают их активность в противофазе. Возбуждение 1 пейсмекера приводит к активации мотонейрона сгибателей и подавлению 2 пейсмекейкера. Тогда же, когда прекращается активность 1 пейсмекера, может активироваться 2 пейсмекер, который поддерживает заторможенное состояние 1 пейсмекера, а также активацию мотонейронов разгибателей. Две верхних кривых представляют собой внутриклеточное отведение от пейсмекера 1 и 2, нижние кривые представляют внеклеточное отведение от мотонейронов сгибателей (F) и разгибателей (E).

Fig. 22.10. A Hypothetical Pattern Generator consisting of two pacemaker cells (1 and 2) that excite flexor and extensor motoneuron pools, respectively. The pacemaker cells discharge with a spontaneous rhythm and are coupled by inhibitory interneurons (black) that ensure that their discharge is out of phase. When pacemaker 1 fires, the flexor motoneuron is activated and pacemaker 2 is suppressed. When pacemaker 1 falls silent, pacemaker 2 can fire, maintaining the silence of pacemaker 1 and activating the extensor motoneuron. The upper two traces represent intracellular records from pacemakers 1 and 2; the lower traces represent extracellular recordings from flexor (F) and extensor (E) motoneurons.

трального ритма во многих случаях включает комбинацию пейсмекеров и сетевых механизмов[40, 41].

Локомоция

Во время локомоции каждая нога проделывает элементарные шагающие движения, которые состоят из двух компонентов[42]: (1) качательная фаза, во время которой нога, вытягиваясь назад, сгибается, поднимается над землей и устремляется вперед и вытягивается вновь, чтобы наступить на землю, и (2) устойчивая фаза, когда нога, будучи в контакте с поверхностью, двигается назад по отношению к направлению, выбранному телом. Последовательность движений конечностей является стереотипной реакцией.

На рис. 22.11 показано, что у шагающей кошки сначала поднимается левая задняя конечность, затем — левая передняя, правая задняя и только потом — правая передняя нога. Если же кошка начинает двигаться быстрее, происходит два типа изменений: (1) генератор движений для каждой конечности укорачивает устойчивую фазу, но вместе с тем усиливает отталкивание от поверхности. Качательная фаза при этом остается относительно постоянной. (2) Увеличение скорости может также вовлекать изменения походки, зависящей от координации движений конечностей. Движение «рысью» базируется на одновременном поднятии двух конечностей, а галоп предполагает, что от земли могут отрываться все четыре конечности одновременно. Стереотипный характер этих реакций предполагает, что в ЦНС имеется целый ряд **двигательных программ**, которые «проигрываются» после получения соответствующей команды. Имеется достаточно много свидетельств того, что существуют заранее заложенные, генетически предопределенные двигательные программы, которые появляются спонтанно, независимо от приобретенного опыта[43, 44].

Еще в 1911 году Браун[45] показал, что в спинном мозге кошки имеются простые нейронные сети, обеспечивающие шагательные движения. Попеременное поднятие и опускание задних конечностей могло наблюдаться у кошки (подвешенной над бегущей дорожкой), у которой спинной мозг был пересечен на уровне грудных сегментов. Дальнейшие эксперименты показали, что у спинальной кошки введение ДОФА (предшественника биогенных аминов — см. главу 9) позволяет сохранять походку, несмотря на ускорение движения дорожки[46]. Наиболее важное значение этих экспериментов с клинической точки зрения заключается в том, что после пере-

Рис. 22.11. Четыре различных двигательных паттерна локомоции во время шагания, рыси, иноходи и галопа. Светлые линии показывают время, в течение которого конечность оторвана от земли (качательная фаза, во время которой активны мотонейроны сгибателей). Во время шагания конечности двигаются последовательно, сначала с одной стороны, потом — с другой. Во время рыси используется другой паттерн координации конечностей: противоположные по диагонали конечности поднимаются одновременно. При иноходи ритм меняется вновь: конечности с одной стороны поднимаются одновременно. Гораздо более быстрым является галоп, во время которого от поверхности отрываются сначала задние, а потом — передние конечности.

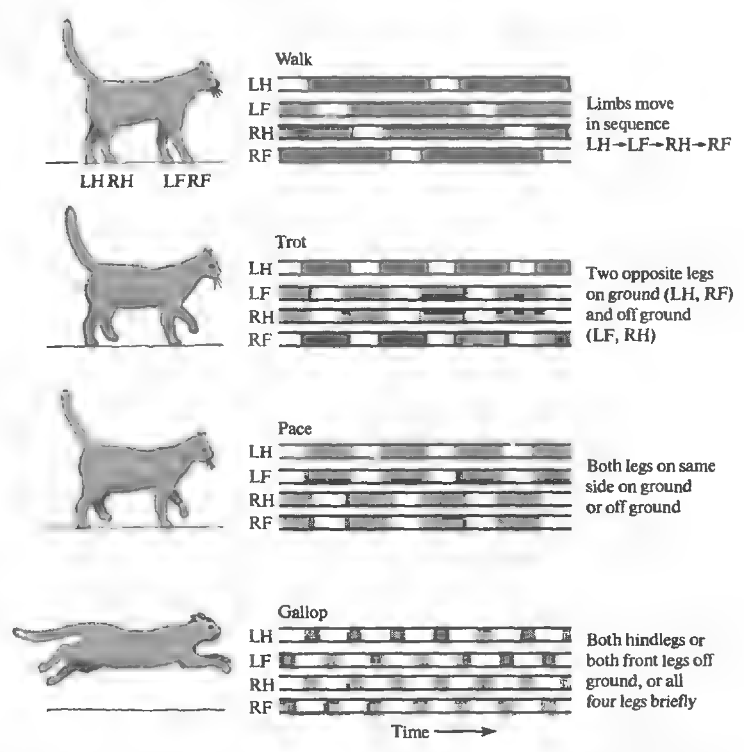


Fig. 22.11. The Stepping Pattern of a Cat during walk, trot, pace, and gallop, four different gaits of locomotion. The white bars show the time that a foot is off the ground (the swing phase, during which flexor motoneurons are active); the light bars show the time a foot is on the ground (the stance phase, during which extensor motoneurons are active). During walking, the legs are moved in sequence, first on one side, then on the other. During a trot, a different pattern of interlimb coordination is used: Diagonally opposite limbs are raised together. In a pace, the rhythm changes again, the limbs on the same side being raised together. Faster still is the gallop, in which the hindlimbs and then the front limbs leave the ground. LF = left foreleg, LH = left hindleg, RF = right foreleg, RH = right hindleg. (After Pearson, 1976.)

сечения спинного мозга биогенные амины помогают адаптироваться к шагательным движениям с возрастающими нагрузками[47, 48]. Это означает также, что эффективность генетически заложенных двигательных программ может быть повышена за счет практики. В согласии с этим находятся данные о том, что тренировка на бегущей дорожке может обучить движениям при параплегии у человека[49]. В этих экспериментах запуск движений конечностей происходил в результате контакта с дорожкой, и после определенной практики такого рода происходило улучшение симптоматики. Объяснение этому базируется, по-видимому, на том, что центральные генераторы ритма активируются сенсорным притоком (поскольку дорожка перемещает конечность) и эта рефлекторная реакция усиливается за счет многих повторений.

Взаимодействия сенсорной импульсации и центральных генераторов ритма

Как указывалось ранее, наличие сенсорного притока с периферии не является обязательным условием для генерации ритмической двигательной активности. Так, после отделения нервной системы таракана от сенсорных входов мотонейроны продолжают генерировать импульсы, которые позволяют ему нормально передвигаться[50]. Аналогично, изолированные сегменты спинного мозга миноги[51, 52], черепахи[53, 54], крысы[39] сохраняют такие ритмические разряды мотонейронов, которые происходят у интактных животных во время плавания или шагания.

Многие движения, независимо от того, являются ли они ритмическими или нет, могут

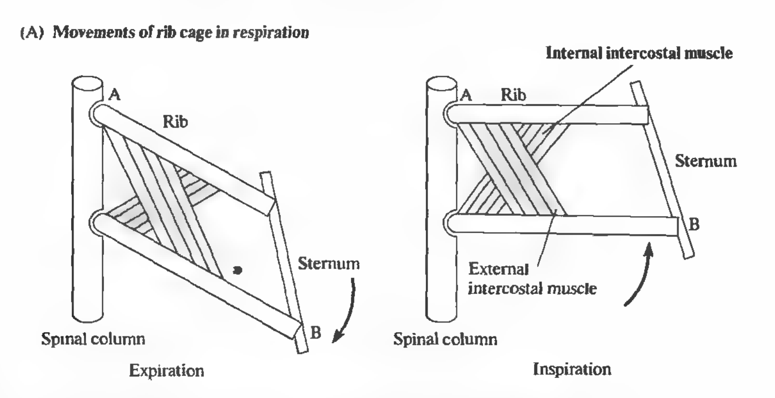
совершаться в отсутствие сенсорной импульсации. Например, во время пения птиц последовательные движения мышц происходят так быстро, что просто не оставляют времени для реализации обратной связи от рецепторов: следующая команда из ЦНС поступает еще до того, как происходит анализ последствий предыдущей команды. Как приматы, так и человек могут совершать достаточно тонкие выработанные ранее движения даже в условиях деафферентации конечностей[55]. Однако в отсутствие обратной связи точность движений начинает страдать по мере усложнения заданий, по-видимому как результат накопления мелких ошибок.

У человека, например, становится нечетким почерк. Кроме того, деафферентация существенно нарушает способность к обучению новым двигательным навыкам, так же, как удаление соматосенсорной коры. После одностороннего удаления полей 1, 2 и 3 (первичная соматосенсорная кора), обучение у приматов незнакомым заданиям на стороне, контралатеральной повреждению, было существенно затруднено[56]. Интересно, что повреждение коры после выработки двигательных навыков существенно не сказывалось на их выполнении. Таким образом, нельзя говорить о том, что наличие врожденных программ движений в условиях целого организма приводит к полному игнорированию сенсорного потока. Например, легкое касание палочкой стопы кошки во время выполнения качательной фазы шагательных движений приводит к аккуратному перешагиванию через это препятствие. Было показано, что важная информация о состоянии мышц-удлинителей во время локомоции приходит по Ib афферентам от сухожильных органов Гольджи. Это оказывает немедленное влияние на силу и длительность устойчивой фазы шагательных движений[22, 57, 58]. Контроль мышечных веретен посредством γ' мотонейронов представляет собой другой способ модуляции двигательной команды. Ко-активация α- и γ-мотонейронов устанавливает длину экстрафузальных мышечных волокон. Если внешнее препятствие мешает нормальиому перемещению конечности, усиленный афферентный поток приводит к дополнительному возбуждению мотонейронов. Задача сенсорной импульсации — адаптировать выполнение текущей двигательной команды к изменяющимся условиям функционирования. Взаимодействие сенсорного притока и внутренних генераторов ритма лучше всего представлено на примере простого ритмического акта, каким является дыхание.

Дыхание

От момента перерезки пуповины до последнего дня нашей жизни постоянный приток кислорода и удаление двуокиси углерода обеспечивается непрерывной работой легких. Две антагонистические группы мышц обеспечивают поступление и последующую откачку воздуха из легких. Во время вдоха грудная клетка увеличивается благодаря сокращению межреберных мышц и диафрагмы. В результате этого происходит расширение легких и последующий вход в них воздуха. Другие мышцы грудной клетки и живота также в разной степени принимают участие в акте вдоха и выдоха, в зависимости от положения тела, скорости и глубины дыхания[59]. Пример дыхательного ритма показан на рис. 22.12. Активность каждой мышцы могла быть зарегистрирована датчиком напряжения или записью электрических сигналов электродом, введенным в саму мышцу — электромиографией. Рис. 22.12 показывает, что сокращения мышц вдоха и выдоха сопровождаются залпами потенциалов действия соответствующим разрядам двигательных единиц. Очевидно, что обе группы мышц сокращаются в противофазе.

Во время дыхания рефлекс растяжения вносит свой вклад в величину вдоха и выдоха, поддерживая возбудимость мотонейронов по мере того, как поочередно внутренние и наружные мышцы подвергаются растяжению. Каждый Ia афферент, генерирующий импульсы с частотой около 100/с, вносит вклад в суммарный ВПСП в гомонимных мотонейронах (то есть мотонейронах, иннервирующих ту же мышцу), а также, через интернейроны, приводит к торможению мышц-антагонистов. В течение всего цикла, благодаря работе фузимоторных волокон (аксонов γ-мотонейронов), афференты поддерживают высокую частоту импульсации даже тогда, когда мышцы активно сокращаются [27, 28] (см. рис. 22.8). Фузимоторные волокна подстраивают длину мышечных веретен к той длине мышцы, которая ожидается во время этой половины цикла. Если какое-то препятствие ограничивает ожидаемое движение, укороченное мышечное веретено будет растягиваться, увеличивая возбудимость соответствующих мотонейронов.





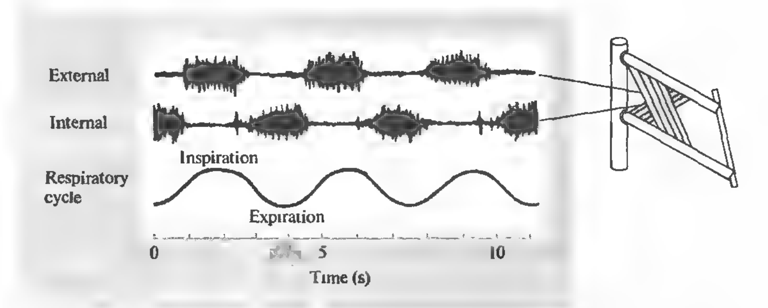


Рис. 22.12. Движения грудной клетки и дыхательных мышц во время выдоха и вдоха. (A) Действие внутренних межреберных мышц (опускающих ребра во время выдоха) и наружных межреберных мышц (поднимающих ребра во время вдоха). (B) Активность дыхательных мышц у кошки, регистрируемая с помощью игольчатых электродов. Разряды наружных и внутренних межреберных мышц следуют в противофазе.

Fig. 22.12. Movements of Rib Cage and Respiratory Muscles during expiration and inspiration. (A) Actions of the internal intercostal muscles (depressing the ribs during expiration) and external intercostal muscles (raising the ribs during inspiration). (B) Activity of respiratory muscles in the cat, recorded with needle electrodes. Discharges of the external and internal intercostal muscles are out of phase.

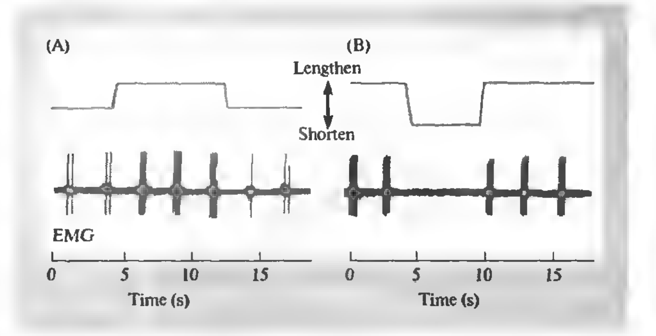


Рис. 22.13. Рефлекс растяжения инспираторной мышцы. Во время каждого вдоха электромиограмма (EMG) от небольшой мышцы, поднимателя ребра, показывает залпы потенциалов действия и мышечное сокращение. (A) Удлинение мышцы при потягивании за сухожилие увеличивает интенсивность разрядов за счет усиления рефлекторной активации моторных единиц. (B) Укорочение мышцы, которое ослабляет рефлекторные реакции, уменьшает активность EMG.

Fig. 22.13. Stretch Reflex of an Inspiratory Muscle. During each inspiration the electromyogram (EMG) from a small muscle, the levator costae, shows bursts of action potentials, and the muscle contracts. (A) Lengthening of the muscle by pulling on its tendon increases the burst activity by increasing the reflex drive on the motor unit. (B) Shortening of the muscle, which removes the reflex drive, reduces the EMG activity. (From Hilaire, Nicholls, and Sears, 1983.)

Рис. 22.13 показывает влияние на электрическую активность мышцы растяжения, вызванного удлинением или укорочением инспираторной мышцы (подниматель ребра) за счет потягивания за сухожилие. При каждом вдохе электромиограмма показывает залповую активность. Активность повышается при растяжении мышцы (рис. 22.13A), хотя и без

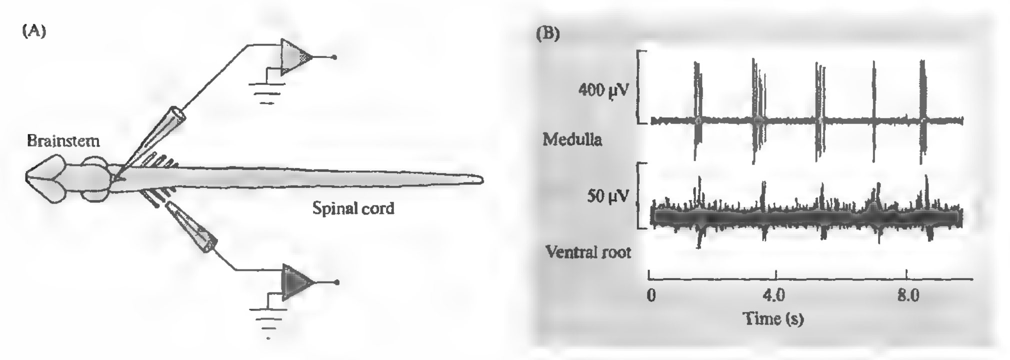


Рис. 22.14. Дыхательный ритм, отводимый от стволовых нейронов изолированной ЦНС новорожденного опоссума (А). (В) Две стволовых клетки генерируют регулярные разряды с межимпульсными интервалами около 2 с. Одновременное отведение от грудных вентральных корешков показывает соответствующие разряды дыхательных мотонейронов.

Fig. 22.14. Respiratory Rhythm Recorded from Brainstem Neurons in an isolated central nervous system from a neonatal opossum (A). (B) Two brainstem cells discharge regularly with an interburst interval of about 2 s. Simultaneous recording from a thoracic ventral root shows the corresponding discharge of respiratory motoneurons. (Kindly provided by D. J. Zou and J. G. Nicholls.)

существенных изменений паттерна. Хотя единичные ВПСП при активации афферентов и малы, но их суммарный эффект является достаточно мощным, чтобы подавить способность мотонейрона вызывать сокращение во время прекращения растяжения (рис. 22.13В).

Как же генерируется дыхательный ритм? Пересечение продолговатого мозга у кошки приводит к прекращению дыхания[59]. Это говорит о том, что генератор ритма лежит не в спинном мозге. Как в продолговатом мозге, так и в области моста находятся нейроны, разряжающиеся во время вдоха или выдоха и вызывающие возбуждение и торможение соответствующих мотонейронов. Например, во время вдоха мотонейроны, снабжающие наружные межреберные (инспираторные) мышцы, деполяризуются за счет ВПСП, приходящих из дыхательного центра продолговатого мозга. Инспираторная фаза прекращается залпом тормозных импульсов, приходящих из центральных нейронов, ассоциированных с выдохом[60, 61].

Пример такого ритмически активного нейрона ствола мозга новорожденного опоссума[62] показан на рис. 22.14А. Верхняя запись на рис. 22.14В представляет собой внеклеточное отведение от одиночного нейрона в продолговатом мозге. На этой регистрации видны короткие залпы импульсов с периодом около 2 с. На нижней записи отведение от грудных вентральных корешков показывает соответствующие ритмические разряды мотонейронов, снабжающих дыхательные мышцы и следующие с той же частотой, хотя и с небольшой задержкой. Свойства и синаптические контакты нейронов продолговатого мозга, вовлеченных в генерацию дыхательного ритма пока изучены недостаточно. Пейсмекерные осциллирующие нейроны найдены у новорожденных крыс в области вентральной части продолговатого мозга (названной pre-Botzinger complex) и вовлечены в генерацию дыхательного ритма[63)–65]. В этот процесс вовлечены также реципрокные связи между интернейронами.

Частота и глубина дыхания зависят от уровня CO_2 в артериальной крови[66]. В условиях низкого уровня CO_2 частота и глубина дыхания снижаются, и наоборот, дыхание усиливается при повышении уровня CO_2. Этот эффект зависит от импульсов, приходящих от хеморецепторов каротидного синуса и аорты, а также от нейронов продолговатого мозга, чувствительных к уровню CO_2[67]. Залпы импульсов в индивидуальных нейронах, контролирующих инспираторные и экспираторные мотонейроны, критически зависят от уровня CO_2. Вариации концентрации CO_2 транслируются в изменения частоты разрядов интернейронов, а от них, соответственно, передаются к мотонейронам. [68] Таким образом, сенсорные входы в стволе мозга играют весьма важную роль в модуляции дыхательного ритма.

§ 4. Организация двигательных путей

Организация спинальных мотонейронов

Рис. 22.15 показывает порядок расположения мотонейронов в поперечном срезе спинного мозга на уровне шейных сегментов. Мотонейроны мышц-разгибателей располагаются впереди по отношению к мотонейронам сгибателей. Мотонейроны, снабжающие туловище и проксимальные конечности, располагаются впереди и более центрально. Для них характерна устойчивая активность, поддерживающая позу и осанку. Латеральные мотонейроны иннервируют дистальные мышцы, для которых характерны фазные движения[69]. Активность медиальных мотонейронов координируется длинными спинальными интернейронами, которые посылают свои отростки на несколько сегментов спинного мозга. Короткие спинальные интернейроны представлены в основном в шейном и поясничном расширениях спинного мозга, где они координируют латеральные мотонейроны.

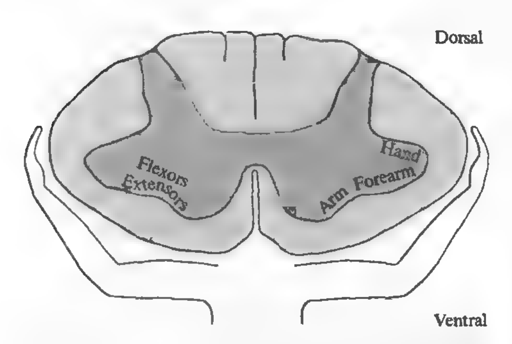


Рис. 22.15. Организация мотонейронов, снабжающих верхние конечности, показанная в поперечном сечении спинного мозга в шейной области. Мышцы плечевого пояса и рук представлены более медиально, тогда как мышцы кистей — более латерально. Мотонейроны мышц разгибателей локализуются на самом краю серого вещества; мотонейроны сгибателей — более центрально.

Fig. 22.15. Organization of Motoneurons supplying the upper extremities, shown in a transverse section of the spinal cord in the cervical region. Muscles of the shoulder and arm are represented most medially, those of the hand most laterally. Extensor motoneurons are located nearest the margin of the grey matter; flexor motoneurons are more central.

Супраспинальный контроль мотонейронов

Главный нисходящий тракт к мотонейронам начинается в коре больших полушарий и в стволе мозга (рис. 22.16, см. также приложение С). В соответствии с тем, какой части передних корешков серого вещества они достигают, эти пути разделяются на две группы: латеральные и медиальные[70]. Два главных латеральных тракта представляют собой **латеральный кортикоспинальный тракт**, начинающийся в коре мозга и **руброспинальный тракт**, начинающийся в красном ядре среднего мозга. Медиальные пути включают **вентральный кортикоспинальный тракт**, латеральный и медиальный **вестибулоспинальные тракты**, **ретикулоспинальные тракты**, идущие от моста и продолговатого мозга, а также **тектоспинальный тракт**.

Читателя, не близко знакомого с данной темой, эти термины могут привести в замешательство. К счастью, здесь есть достаточно простые правила. Тракты называются по участкам мозга, с которого они начинаются и на котором заканчиваются. Вдобавок в названии есть указание на то, в какой части спинного мозга они проходят (вентральный, медиальный). Ряд терминов, указывающий локализацию трактов, указан в приложении С.

Латеральные двигательные пути

Латеральный кортикоспинальный тракт начинается в моторной и премоторной области коры больших полушарий мозга впереди от центральной извилины (поля 4 и 6 по Бродману, см. приложение С), а также от небольшой полоски в постцентральной области (поле 3, рис. 22.17). Волокна направляются вниз через внутреннюю капсулу и ножки мозга к пирамидам продолговатого мозга, после чего они пересекают срединную линию и продолжаются дальше в составе латеральных нисходящих трактов спинного мозга. Волокна латерального кортикоспинального тракта оканчиваются преимущественно на интернейронах и мотонейронах латеральной группы, которые контролируют дистальную группу мышц, отвечающую за тонкие движения пальцев[71]. Многие окончания этого тракта переключаются прямо на мотонейроны, контролирующие мышцы пальцев[72, 73]. У человека и других приматов перерезка латерального кортикоспинального тракта приводит прежде всего к потере способности независимого движения пальцами и,

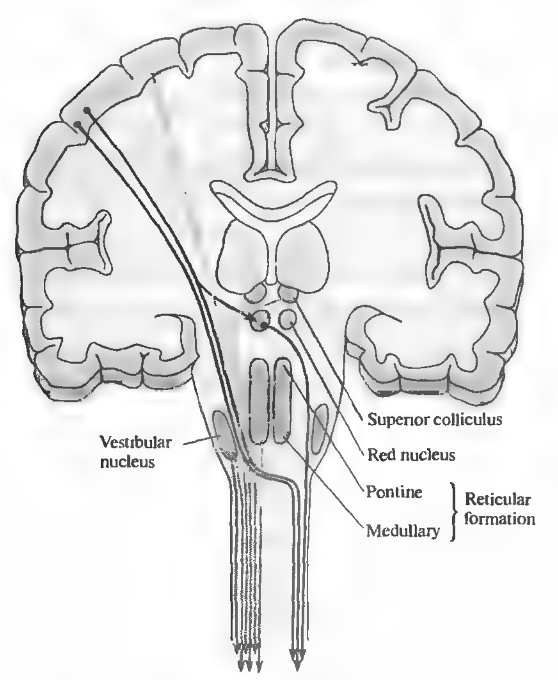


Рис. 22.16. Главные двигательные пути в ЦНС позвоночных, снабжающие латеральные мотонейроны (черные) и медиальные мотонейроны (серые), показанные схематически на срезах полушарий головного мозга, продолжающихся в продольные срезы ствола мозга и спинного мозга. Клетки в первичной двигательной зоне посылают аксоны на контралатеральную сторону спинного мозга, формируя латеральный кортикоспинальный тракт с коллатералями к красному ядру. Аксоны клеток красного ядра пересекают срединную линию и спускаются в составе руброспинального тракта. Эти тракты переключаются моно- и полисинаптически, в основном на латеральных мотонейронах. Некоторые кортикальные волокна спускаются без пересечения, формируя передний кортикоспинальный тракт с коллатералями к ядрам ствола. Аксиальная мускулатура снабжается преимущественно моторными зонами ствола через: ретикулоспинальный тракт, начинающийся с ретикулярной формации ствола мозга и моста; вестибулоспинальный тракт, начинающийся в вестибулярных ядрах; тектоспинальный тракт, начинающийся в верхнем четверохолмии.

Fig. 22.16. Major Motor Pathways in the vertebrate central nervous system supplying lateral motoneurons (black) and medial motoneurons (grey), shown schematically on a coronal section of the cerebral hemispheres, continuing to a longitudinal section of the brainstem and spinal cord. Cells in the primary motor area of the cerebral cortex send axons to the contralateral spinal cord to form the lateral corticospinal tract, with collateral connections to the red nucleus. Axons from cells in the red nucleus cross the midline and descend in the rubrospinal tract. These tracts supply monosynaptic and polysynaptic innervation largely to lateral motoneurons (i. e., those supplying distal musculature). Some cortical fibers descend without crossing to form the ventral corticospinal tract, supplying collaterals to brainstem nuclei. The axial musculature is supplied predominantly by the motor regions of the brainstem through the reticulospinal tracts, originating in the pontine and medullary reticular formations; the vestibulospinal tracts, originating in the vestibular nuclei; and the tectospinal tract, originating in the superior colliculus.

как следствие, к нарушению тонких, точных движений кисти[74, 75].

Руброспинальный тракт начинается в красном ядре (рис. 22.16) и пересекает срединную линию еще до того, как начинает спускаться в спинной мозг. Он заканчивается на интернейронах и, частично, на мотонейронах[76], ассоциированных с латеральной двигательной системой. Клетки в красном ядре расположены соматотопически и получают возбуждающие входы от моторной коры и мозжечка. Точная роль руброспинального тракта не известна. По-видимому, он дублирует многие функции кортикоспинального тракта и представляет, таким образом, параллельный ему путь. У приматов повреждение этого тракта вызывает лишь незначительные изменения. Однако после повреждения как руброспинального, так и кортикоспинального трактов координированные движения рук и ног значительно нарушаются[77, 78].

Медиальные двигательные пути

За исключением небольшого компонента от вентрального кортикоспинального тракта, медиальные пути начинаются преимущественно в стволе мозга (рис. 22.16) и посылают свои волокна к медиальным мотонейронам, иннервирующим проксимальную группу мышц. Нейроны, начинающие латеральный вестибулоспинальный тракт, лежат (как показывает название) в латеральном вестибулярном ядре. Каждое вестибулярное ядро получает входы от ипсилатерального вестибулярного аппарата (см. главу 17). Этот тракт спускается без пересечений в спинной мозг к медиальной группе мотонейронов, снабжающих позные мышцы. Здесь окончания формируют моносинаптические возбуждающие входы на мотонейронах мышц-разгибателей и, переключаемые через интернейроны, тормозные входы на сгибатели. Функция латерального вестибулоспинального тракта заключается в регуляции поло-

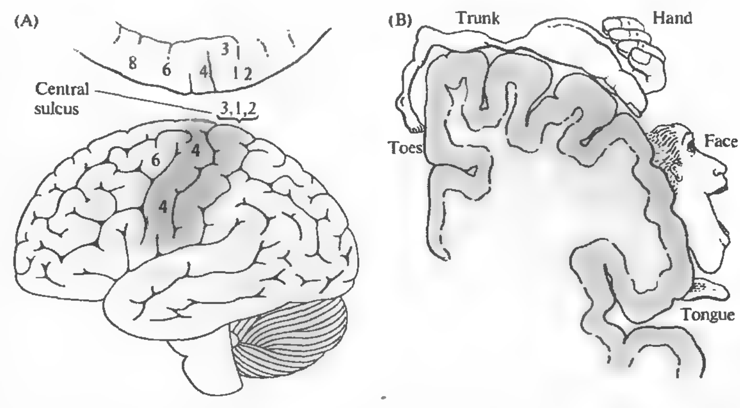


Рис. 22.17. Двигательное представительство в коре. (А) Боковой вид поверхности коры больших полушарий. Двигательная активность связана с активацией нейронов в поле 4 коры больших полушарий, включая клетки, формирующие кортикоспинальный тракт. Это первичная моторная зона M_1. Моторная система включает также поле 6 (премоторная область), распространяющееся на медиальную поверхность полушарий. (B) Срезы мозга через полушария впереди от центральной борозды. Мускулатура человеческого тела представлена в последовательном, но непропорциональном порядке, с ногами и ступнями, представленными на медиальной поверхности и головой — в латеральной области. Очень большая область связана с кистями рук, что отражает большое число нейронов, отвечающих за контроль движений пальцев рук.

Fig. 22.17. Motor Representation on the Cerebral Cortex. (A) Lateral view of the surface of the cerebral cortex. Motor activity is associated with activation of cells in area 4 of the cerebral cortex, including the cells of origin of the corticospinal tract. This is the primary motor area M_1. The motor system also includes area 6 (premotor area), extending onto the medial surface of the hemisphere. (B) Coronal section through the cerebral hemisphere anterior to the central sulcus. The musculature of the human body is represented in an orderly, but distorted, fashion, with the leg and foot on the medial surface of the hemisphere, and the head most lateral. The very large area devoted to the hand is indicative of the number of neurons involved in control of manipulations by the digits.

жения тела в пространстве и формировании разгибательного (препятствующего силе тяжести) тонуса. Ретикулоспинальный тракт моста спускается по своей стороне без пересечений и переключается на интернейронах, которые, в свою очередь, обеспечивают двухстороннее возбуждение медиальных мотонейронов разгибателей. Ретикулоспинальный тракт продолговатого мозга спускается с двух сторон для торможения мотонейронов, контролирующих проксимальные конечности.

Два других медиальных тракта ствола мозга заканчиваются на уровне шейных и верхних грудных сегментов спинного мозга и связаны с контролем мышц верхней части туловища, положением рук и особенно головы. Медиальный вестибулоспинальный тракт начинается с нейронов медиального вестибулоспинального ядра, которое, в свою очередь, получает импульсы от полукружных каналов и рецепторов растяжения шеи[79]. Этот тракт спускается по своей стороне до уровня середины грудной клетки и отвечает за поддержание положения шеи и верхних конечностей во время углового ускорения. Тектоспинальный тракт начинается в верхних ядрах четверохолмия и пересекает срединную линию еще до того, как начинает спускаться к верхним шейным сегментам. Этот тракт отвечает за перемещение головы и глаз к зрительным и слуховым раздражителям.

Таким образом, нисходящие пути, происходящие от коры больших полушарий и красного ядра, снабжают латеральные мотонейроны и выполняют важную функцию по организации движений малых мышечных групп, и особенно дистальных мышц конечностей. В частности, кортикоспинальный тракт важен для движений пальцев. Двигательные пути, исходящие от ствола мозга, наоборот, управляют большими группами проксимальных мышц, имеющих значение для положения тела в пространстве, позиции рук и головы. Эти пути находятся под ключевым контролем со стороны вестибулярного аппарата.

§ 5. Двигательная кора и выполнение произвольных движений

Кортикоспинальный тракт начинается в первичной и вторичной моторных зонах, локализованных в прецентральной извилине, а также от первичной и вторичной соматосенсорной коры в постцентральной извилине (рис. 22.17 и 22.18)[80]. Нейроны, с которых начинается этот тракт, расположены

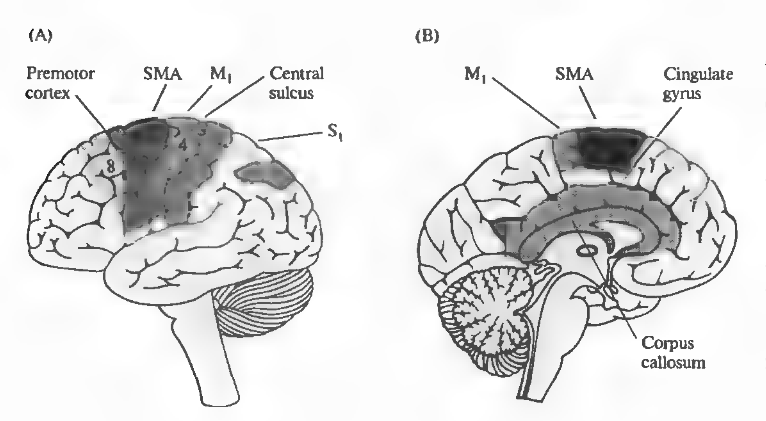


Рис. 22.18. Ассоциативная двигательная кора. (А) Первичная и ассоциативная области двигательной коры располагаются впереди центральной борозды в поле 4 по Бродману (первичная двигательная кора) и поле 6 (премоторная кора и допоянительная двигательная зона, SMA). Фронтальные зрительные области найдены в поле 8. Первичная соматическая кора, S_1 (поля 3, 1 и 2) и особенно ассоциативная соматосенсорная кора (поля 5 и 7) генерируют команды, используемые в планировании движений. (В) Медиальная поверхность полушарий головного мозга. Поясное двигательное поле лежит между собственно поясной извилиной и медиальной частью первичной и дополнительных двигательных зон.

Fig. 22.18. The Association Motor Cortices. (A) The primary and association motor cortices lie anterior to the central sulcus in Brodmann's areas 4 (primary motor cortex) and 6 (premotor cortex and supplemental motor area, or SMA). Frontal eye fields are found in area 8. Primary somatic cortex, S_1 (areas 3, 1, and 2), and especially association somatosensory cortex (areas 5 and 7), generates commands used in motor planning. (B) Medial surface of the cerebral hemisphere. The cingulate motor area lies between the cingulate gyrus proper and the medial extension of the primary motor and supplementary. motor areas

в определенном порядке, образуя соматотопический рисунок в первичной моторной коре — M_1 (рис. 22.17B). Этот факт может быть установлен при прямой электрической стимуляции небольших участков этой области, что приводит к сокращению соответствующих мышц. Кроме того, есть соматотопические проекции от соматосенсорной коры прямо к соответствующим колонкам нейронов в зоне M_1 [81, 82].

Соматотопическая картина двигательной коры была впервые установлена Фритшем и Хитцигом в 1870 году при стимуляции у животных разных участков коры[83]. Соматотопическое представление тела у человека было впервые показано Пенфилдом с коллегами во время нейрохирургических операций[84]. Локальная стимуляция участков коры короткими импульсами приводила к движениям мышц в строго определенной области тела. Так же как и в соматосенсорной коре, в моторной зоне тело представлено не пропорционально, с гораздо большим представительством лица и рук по сравнению с туловищем. Неинвазивные современные методы, такие как магнитно-резонансная томография, подтвердили такую организацию моторной коры[85]. Этот метод в сочетании с транскраниальной стимуляцией, а также ряд других методов позволили установить, что картина представительства мышц в моторной коре достаточна пластична и может быть изменена после периферических повреждений[86]. Более того, корковое представительство может быть изменено даже после тренировок, приводящих к появлению новых двигательных навыков[87)—89]. Предполагается, что перераспределение удельных весов синаптических контактов в зоне M_1 может представлять собой основу обучения таким навыкам.[90]

Ассоциативная двигательная кора

Вторичная или ассоциативная моторная кора состоит из премоторной зоны (поле 6 по Brodmann), которая лежит впереди и несколько латеральнее зоны M_1, и дополнительной моторной зоны, также находящейся впереди от M_1 (рис. 22.18). Обе эти зоны организованы соматотопически[91, 92] (хотя и не так четко как M_1) и получают входы от сенсорных ассоциативных зон (задние париетальные поля 5 и 7). Премоторный комплекс находится под сильным влиянием со стороны мозжечка, а дополнительная моторная зона связана с базальными ганглиями. Движения, вызванные электрической стимуляцией премоторной и дополнительной ассоциативных зон являются достаточно сложными и часто вовлекают мышцы с обеих сторон тела.

Рис. 22.19. (См. цветную вклейку после с. 640.) Функциональная ядерно-магнитная томография двигательной коры человека, активированной во время письма. Каждое изображение коры кодировано в цвете, показывающем области, в которых повышена активность. Четыре верхних изображения показывают активность, когда палец ноги использовался для изображения зигзага (левая пара) или имени субъекта (правая пара). Четыре нижних изображения построены по тому же принципу, но для письма с использованием пальцев руки. Процедура вычитания изображений, результат которого показан на двух левых рисунках, позволила вычислить области, активируемые во время подписывания своего имени, независимо от того, пальцы ног или рук были для этого использованы. Активной оказалась премоторная кора в области представительства кисти, так же как ассоциативная соматосенсорная кора и область латерального мозжечка

Fig. 22.19. Functional MRI of Human Motor Cortex activated during signature writing. Each cortical image is color-coded to indicate areas in which activity is higher than at rest. The upper four images show activity when the toe was used to write a zigzag (left pair) or the subject's name (right pair). The bottom four images are arranged similarly for writing with the finger. Subtractive analysis was used to construct the two images on the right, which show areas that were activated during writing of the signature, whether finger or toe was used. The premotor cortex in the region of the hand representation was active, as well as the somatosensory association cortex and a region of the lateral cerebellum. (From Rijntjes et al., 1999.)

Связанная с движениями активность наблюдалась в обеих этих зонах при анализе мозга человека методом позитронно-эмиссионной томографии[93)]. Обе зоны дают соматотопические проекции в первичную моторную зону. Предполагается, что вместе с сенсорными полями, такими как задняя париетальная область, премоторная и дополнительная моторная кора принимают участие в планировании или программировании двигательных актов[94)–96)].

Яркий пример программирования движений премоторной корой заключается в разных способах, которыми человек может поставить свою подпись. Обычно эта процедура у большинства людей достигает совершенства и выполняется доминирующей рукой. Однако эта двигательная программа может быть перенесена на совершенно другую группу мышц. Так, Эдриан[97)] показал, что после того, как вы научились ставить свою подпись, вы можете сделать это даже, если держите карандаш между пальцами ног! Это значит, что в двигательной системе должна быть размещена программа выполнения подписи, вне связи с какой-то определенной группой мышц. Методом магнитно-резонансной томографии была проанализирована активность мозга во время выполнения подписи пальцами рук или ног. Эта активность сравнивалась с выполнением случайной двигательной программы (нарисовать зигзаг)[98)]. Оказалось, что при выполнении подписи была активирована премоторная кора в участке, контролирующем *кисть*, причем независимо от того, исполнялась ли подпись действительно рукой или ногой (рис. 22.19). Итак, выученная двигательная программа хранится в ассоциативной коре в зоне ответственности за тренированную конечность, но эта программа может быть выполнена и совсем другой конечностью.

Еще одна область с особыми двигательными функциями локализуется в области поясной извилины под дополнительной моторной зоной[99)]. Поясной комплекс лежит выше мозолистого тела (рис. 22.18) и представляет собой часть лимбической системы, контролирующей поведенческие акты[100)]. Нейрональная активность в этой области связана с движениями, подкрепляемыми вознаграждением[101)].

Активность кортикальных нейронов

Как активность нейронов в моторной коре связана с началом и выполнением движений? Способны ли нейроны в M_1-зоне прямо управлять активностью отдельных мышц, силой сокращения специфических мышечных групп, величиной смещения относительно сустава, а также влиять на направление движения? Такие вопросы поставил перед собой Эвартс[102, 103)], который отводил активность пирамидных клеток в моторной коре обезьяны во время выполнения заученных движений кисти (рис. 22.20). С помощью нагрузки, уравновешивающей сгибание или разгибание кисти, Эвартс смог отделить силу, необходимую для выполнения движения, от его направления. Было обнаружено, что часть кортикальных нейронов активна во время сгибания, а другие — во время разгибания, а интенсивность их разрядов пропорциональна силе, с которой выполняется движение[104)]. Это поведение существенно не отличалось от реакции спинальных мотонейронов, с которыми кортикальные нейроны были связаны. Последующие эксперименты показали, что конкретная реакция (участие в сгибании или разгибании) является характерной для

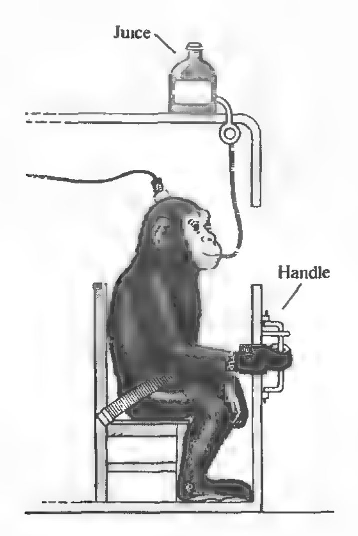


Рис. 22.20. Схема эксперимента по регистрации активности нейронов во время движений кисти. Обезьяна, предварительно обученная передвигать рукоятку в определенное положение, сидит на стуле с манжетами, одетыми на предплечье. Обезьяна отклоняет рукоятку влево или вправо, сгибая или разгибая запястье. Система грузов или вращающих двигателей используется для уравновешения сгибания или разгибания. Для визуального контроля движений положение рукоятки изображается на дисплее. В случае успешного достижения необходимой позиции, обезьяна получает вознаграждение в виде фруктового сока. Активность одной нейромоторной единицы регистрируется микроэлектродом, введенным в соответствующую зону мозга с помощью микроманипулятора, фиксированного к черепу.

Fig. 22.20. Experimental Arrangement for Recording Cellular Activity related to wrist movement. A monkey, previously trained to move a handle to a designated position, is seated in the chair with its forearm placed in a cuff. The monkey deflects a handle to the left or right between stops, by flexion or extension of the wrist. A system of weights, or a torque motor (not shown), is used to load the handle to oppose either flexion or extension. For visually guided movements, the handle position is indicated on a display screen. When the monkey places the handle in the designated position, it receives a reward of fruit juice. Single-unit activity is recorded with a microelectrode positioned in an appropriate area of the brain, by means of a microdrive fixed to the skull.

определенных кортикоспинальных нейронов, прямо оканчивающихся на мотонейронах[72)]. Другие классы нервных клеток демонстрируют более сложное поведение, зависящее от исходной нагрузки и начальной позиции конечности[105)].

Активность корковых нейронов, связанная с направлением движения

Для того, чтобы дотянуться и схватить определенный объект, нервная система должна совершить ряд вычислений. Зрительный анализатор определяет объект и его положение в пространстве. Положение объекта затем должно быть сопоставлено с тем местом, где находится рука, и разработана траектория движения к цели. Наконец, пространственная траектория должна быть превращена в координированное сокращение мышц. Какие из этих процессов происходят в первичной моторной коре? Эксперименты по контролируемому перемещению конечностей показывают, что некоторые нейроны в первичной моторной коре в участке, отвечающем за движение руки, разряжаются с максимальной частотой тогда, когда движение совершается в определенном направлении[106)]. Преимущественное направление не является абсолютным, изменение угла движения приводит не к устранению, а к уменьшению частоты разрядов нейронов. Более того, преимущественное направление зависит от начальной позиции конечности или позиции тела[107, 108)].

Нейроны зоны M_1, отвечающие за сходное направление, образуют кластеры, функционально объединенные возбуждающими синапсами. Нейроны, контролирующие противоположное направление движений, обладают способностью ингибировать друг друга[109)]. Георгопулус с коллегами[110)—112)] предположили, что траектория движения определяется активностью ансамбля нейронов. Выходной сигнал нейронального ансамбля кодирует направление, которое эквивалентно суммарному вектору преимущественного направления отдельных активных нейронов (рис. 22.21). Такое векторное кодирование напоминает способ определения направления в зрительном анализаторе[133)].

Планирование движения

Как нейроны в зоне M_1 определяют пространственную локализацию цели? Шен и Александер[114)] обучили обезьян совершать движения к предмету, находящемуся либо прямо перед ними, либо располагающемуся под углом в 90° С. При этом им удавалось различать нейрональную активность, которая была либо зависима от положения цели, либо от самого движения. Некоторые нейроны в M_1 зоне активировались только во время движения конечностей. Однако многие нейроны активировались сначала при определении локализации цели, а затем при завершении движения. Этот факт предполагает, что трансформация определения пространственной локализации в мышечную активность происходит

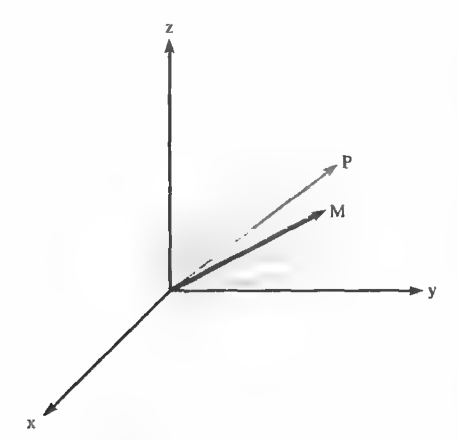


Рис. 22.21. Кодирование движений в моторной коре. Предпочтительное направление движения для кортикальных нейронов, представленное в трех проекциях. Активность каждого нейрона во время отработанных движений конечностей показана как скаляр, длина которого пропорциональна частоте разрядов данного нейрона. Суммарный вектор для группы нейронов (P) представлен стрелкой, направление которой совпадает с направлением движения (M).

Fig. 22.21. Encoding Movement in the Motor Cortex. The preferred direction of cortical neurons is shown in three dimensions. The activity of each neuron during a trained limb movement is plotted as a scalar whose length is proportional to its rate of firing. The vector sum for that population of neurons (P) is an arrow whose direction is similar to that of the movement (M). (After Georgopoulos, Schwartz, and Kettner, 1986.)

в M_1 зоне. Маунткасл и коллеги[115, 116] использовали специальную тренировку, чтобы научить обезьяну различать частоту тактильных стимулов до того, как совершить определенное движение. Они нашли в M_1 зоне нейроны, активность которых соответствовала разным характеристикам раздражителя, независимо от последующего движения, что является, по-видимому, нейрональным коррелятом аппарата, делающего выбор. Таким образом, M_1 зона не только прямо управляет мышечным движением, но принимает также участие в нейрональном анализе, который определяет, какой тип движения будет осуществлен.

Понятно, что для передвижения конечности в определенную точку пространства двигательная система должна следовать координатам на нейрональной карте пространства. Такие пространственные карты не могут находиться только в моторной или премоторной зоне. Ассоциативные зоны париетальной коры объединяют вместе сенсорный поток разных модальностей от зрительного, слухового, тактильного и других анализаторов[117, 118]. Повреждения париетальной коры приводят к синдрому «игнорирования», когда определенные части тела или определенная зона пространства не замечаются[119]. Этот специфический дефект предполагает, что пространство представлено в различных формах в анатомически различающихся частях мозга.

Двигательный контроль представлен в мозге достаточно широко, включая зону M_1, премоторную кору, дополнительную моторную зону и даже соматосенсорную кору[121]. Так же как для сенсорной системы, эта множественность базируется на наличии параллельных проводящих путей двигательной системы. Это отражает также тот факт, что трудно провести четкую границу между планированием и координированием двигательного акта с одной стороны, и с сенсорным притоком, который необходим для запуска и модуляции движений, — с другой. Действительно, расчет двигательного акта является настолько сложным, что у высших позвоночных эволюционно возникла даже необходимость второго «вычислительного центра» в виде специального образования — мозжечка, предназначенного для сопряжения выполнения двигательной команды с механизмом обратной связи.

§ 6. Мозжечок

Мозжечок является выростом моста и состоит из трех слоев коры, покрывающих глубокие ядра мозжечка. Его анатомические свойства суммированы в приложении С. Сопоставление структуры мозжечка позвоночных наводит на мысль, что эволюционно мозжечок появился в результате развития вестибулярных ядер[122]. Действительно, непосредственные соединения мозжечка с первичными вестибулярными афферентами и другими вестибулярными ядрами имеются у всех видов. Однако роль мозжечка в функциях мозга простирается дальше участия в регуляции равновесия и контроля положения тела. Мозжечок также эффективно влияет на неокортекс, он вовлечен в различные формы пластичности и некоторые формы когнитивных процессов[124]. Однако лучше всего изучена его роль в координации движений. Мозжечковые повреждения характеризуются нарушением координации с незначительными изме-

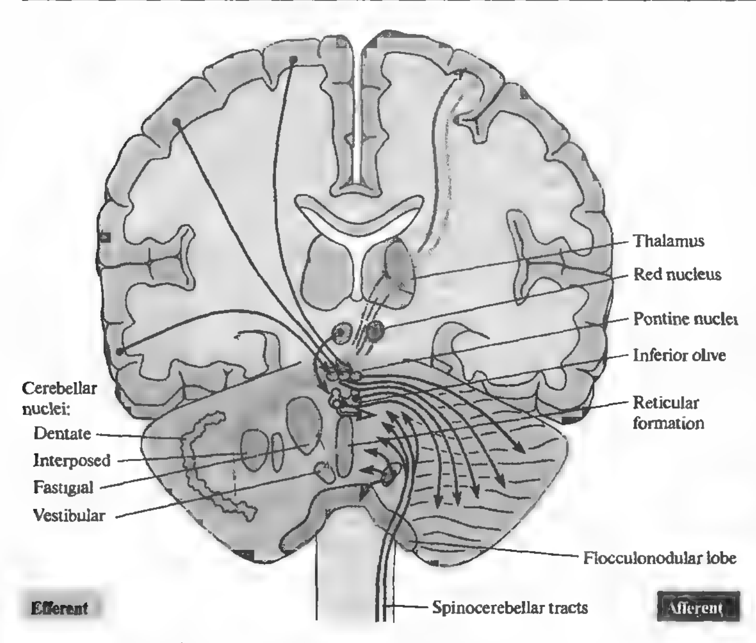


Рис. 22.22. Эфферентные и афферентные пути мозжечка. Полушария мозга, ствол мозга и спинной мозг, показанные совместно с изображением верхней поверхности мозжечка (справа) и нижележащих ядер мозжечка (слева). Выходы из мозжечка (слева, показаны серым) исходят из зубчатого, промежуточного и ядра шатра. Волокна от зубчатого ядра снабжают контралатеральную моторную кору через вентролатеральное и заднее вентролатеральное ядра таламуса. Промежуточное ядро дает проекции в контралатеральное красное ядро. Оба этих тракта связаны, таким образом, с латеральной двигательной системой. Ядро шатра посылает отростки к вестибулярным ядрам и ретикулярной формации, участвуя в контроле медиальной двигательной системы. Входы (справа, показаны черным) в латеральные полушария мозжечка направляются из разных областей коры больших полушарий мозга через ядра моста. Афферентный поток от красного ядра переключается в нижних оливах. Более медиальные части мозжечка получают многочисленные входы от спиномозжечкового тракта. Флоккуло-нодулярная доля снабжается вестибулярными ядрами.

Fig. 22.22. Efferent and Afferent Pathways in the Cerebellum. Cerebral hemispheres, brainstem, and spinal cord, together with a view of the superior surface of the cerebellum (right) and the underlying cerebellar nuclei (left). Outputs from the cerebellum (left side, grey) are through the dentate, interposed, and fastigial nuclei. Fibers from the dentate nucleus supply the contralateral motor cortex through the ventrolateral and parts of the ventroposterolateral nuclei of the thalamus. The interposed nuclei project to the contralateral red nucleus. Both these pathways, therefore, are associated with the lateral motor system. The fastigial nucleus projects to the vestibular nucleus and the pontine and medullary reticular formations, contributing to the medial motor system. Inputs (right side, black) to the lateral hemispheres of the cerebellum are from wide areas of the cerebral cortex, through the pontine nuclei. Afferent input from the red nucleus is relayed through the inferior olive. More medially, the cerebellum receives extensive input from the spinocerebellar tracts. The flocculonodular lobe is supplied by the vestibular nucleus.

нениями силы сокращений мышц или чувствительности. Влияние мозжечка на двигательный контроль опосредовано его мощными связями с премоторной корой, а также, посредством ядер ствола мозга, с двигательными системами спинного мозга.

Мозжечковые связи

Выход из коры мозжечка формируется аксонами **клеток Пуркинье**, которые образуют тормозные синапсы на нервных клетках глубоких ядер мозжечка или на нейронах вестибулярных ядер. Проекции организованы упорядоченным образом (рис. 22.22): аксоны от флоккулярной и нодулярной доли (вестибулярный мозжечок) направляются непосредственно в вестибулярные ядра[125, 126]. Остальные пути проецируются в глубокие ядра в медиолатеральной последовательности. Клетки Пуркинье дают проекции в ядро шатра, в промежуточное ядро и, наконец, в зубчатое ядро.

Детали связей ядер мозжечка показаны на рис. 22.22. Важной особенностью является то, что зубчатое и промежуточное ядра посылают свои выходы к двигательной коре через вентролатеральное ядро таламуса. Таким образом реализуется важное влияние этих ядер мозжечка *на латеральную моторную систему*. Промежуточное ядро проецируется также в красное ядро. С другой стороны, ядро шатра проецируется в вестибулярные ядра и ретикулярную формацию, влияя, таким образом, на вестибулоспинальный и ретикулоспинальный тракты, то есть на *медиальную*

Рис. 22.23. Синаптическая организация мозжечка. Кора мозжечка состоит из гранулярных клеток, клеток Пуркинье и молекулярного слоя. Единственные покидающие кору мозжечка и направляющиеся в глубокие ядра мозжечка волокна представлены тормозными аксонами клеток Пуркинье. Аксоны глубоких ядер мозжечка формируют выходящие пути мозжечка. Входы мшистых волокон возбуждают гранулярные клетки, аксоны которых достигают молекулярного слоя и формируют сеть паралаельных волокон. Параллеаьные волокна образуют возбуждающие синапсы на клетках Пуркинье, звездчатых клетках, корзинчатых клетках и дендритах клеток Гольджи. Лазающие волокна образуют возбуждающие синапсы на клетках Пуркинье. Как мшистые, так и лазающие волокна посылают возбуждающие коллатерали к нейронам глубоких ядер мозжечка.

Fig. 22.23. Synaptic Organization of the Cerebellum. The cerebellar cortex is subdivided into the granule cell, Purkinje cell, and molecular layers. The sole output from the cortical layer to cells of the deep cerebellar nuclei is by inhibitory axons from Purkinje cells. The axons of deep nuclear neurons form the output paths of the cerebellum. Mossy-fiber inputs excite granule cells, whose axons ascend to the molecular layer to form a parallel fiber network. Parallel fibers form excitatory synapses on Purkinje cells, stellate cells, basket cells, and dendrites of Golgi cells. Climbing fibers form excitatory synapses on Purkinje cells. Both climbing fibers and mossy fibers make excitatory connections with cells in the deep cerebellar nuclei.

моторную систему. Соматотопическое устройство, характерное для коры, продолжается и в нисходящих проекциях.

Входы в мозжечок (рис. 22.22) также представлены раздельно. Латеральные полушария коры мозжечка получают входы от обширных областей коры головного мозга (через ядра моста) и от красного ядра (через нижнюю оливу). Флоккуло-нодулярная (клочково-узелковая) доля получает входы от вестибулярного ядра. Медиальная зона мозжечковой коры получает входы, идущие от проприоцепторов и кожных рецепторов на всех уровнях спинного мозга.

По этой причине Шеррингтон говорил о мозжечке как «головном ганглии проприоцептивной системы». Сенсорные входы образуют соматотопическое представительство в мозжечковой коре, совпадающее с моторным представительством тех же участков тела.

Таким образом, мозжечок получает проприоцептивные, вестибулярные и другие чувствительные входы, а также массивные проекции от моторной и ассоциативной коры, сигнализирующие о выполнении или намерении выполнить произвольное движение.

Клеточное строение коры мозжечка

Кора мозжечка состоит из трех слоев (рис. 22.23)[127, 128]. Самый внутренний слой содержит плотно упакованные (общим числом до 10^{10}-10^{11}) **гранулярные клетки**. Эта величина может соответствовать приблизительной сумме всех других клеток нервной системы! Гранулярные клетки посылают аксоны в наружный молекулярный слой, образуя систему **параллельных волокон**, каждое из которых тянется до нескольких миллиметров. В слое гранулярных клеток присутствуют также **клетки Гольджи**, формирующие тормозные синапсы на гранулярных клетках.

Во втором корковом слое находятся клетки Пуркинье, аксоны которых составляют единственный выход из коры мозжечка. Дендриты клеток Пуркинье тянутся в молекулярный слой коры, в сторону параллельных волокон. Параллельные волокна формируют возбуждающие синаптические контакты на шипиках дистальных дендритов клеток Пуркинье. Можно представить себе клетки Пуркинье выстроенными в ряд, как телеграфные столбы, вдоль которых, как проволока, тянутся параллельные волокна. Подсчитано, что каждая клетка Пуркинье получает входы от более чем 200 000 параллельных волокон.

Каждое параллельное волокно объединяет ряд клеток Пуркинье, проецирующихся в определенном порядке к нижележащим ядрам мозжечка. Значение такого объединения состоит в том, что оно может контролировать сразу несколько суставов, например плечо,

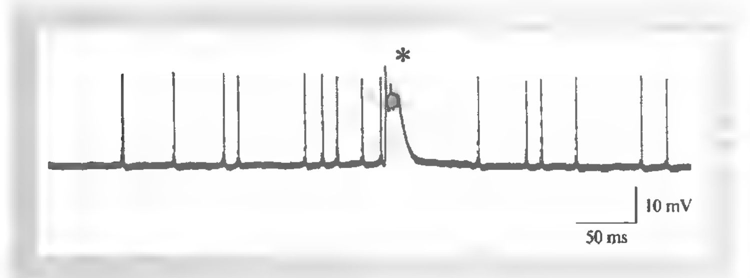


Рис. 22.24. Внутриклеточная регистрация простых и комплексных потенциалов действия в клетках Пуркинье мозжечка кошки. Комплексный потенциал действия (отмечен звездочкой), возникающий в ответ на стимуляцию лазающих волокон, имеет выраженную фазу «плато» и наблюдается при частотах значительно меньших, чем те, которые вызываются синаптическим входом, приходящим от мшистых волокон через гранулярные клетки и параллельные волокна.

Fig. 22.24. Intracellular Recording of Simple and Complex Spikes in a cerebellar Purkinje cell from an anesthetized cat. Complex spikes (star) due to climbing-fiber input have pronounced "plateau potentials" and occur at much lower frequencies than do simple spikes caused by mossy fiber–granule cell–parallel fiber input. (After Martinez, Crill, and Kennedy, 1971.)

локоть и запястье, обеспечивая, таким образом, механизм координации движений в нескольких суставах[128]. Длина параллельных волокон достаточна для того, чтобы объединить клетки Пуркинье, проецирующиеся на соседние глубокие ядра, что может обеспечить межъядерную координацию. Второй корковый слой имеет также в своем составе **звездчатые и корзинчатые клетки**, которые обеспечивают тормозные входы к клеткам Пуркинье от отдаленных параллельных волокон. Этот механизм аналогичен латеральному торможению в сенсорных системах.

Входные сигналы в мозжечок от коры и от сенсорных систем поступают по **мшистым волокнам**, которые создают возбуждающие синапсы с гранулярными клетками, клетками Гольджи и нейронами глубоких ядер. Возбуждение мшистыми волокнами параллельных волокон (аксонов гранулярных клеток) вызывает генерацию **простых спайков** в клетках Пуркинье (рис. 22.24)[129]. Это тоническое возбуждение происходит со скоростью от 50 до 150 в секунду. Одиночное **лиановидное (лазающее) волокно,** идущее от нижней оливы, формирует возбуждающие синапсы на соме и проксимальных дендритах 1–10 клеток Пуркинье. Лиановидные волокна вызывают сильное возбуждение клеток Пуркинье[130, 131], проявляющееся в виде **комплексных спайков** (рис. 22.24). Эта активность вызывает модулируемые потенциал-активируемыми калиевыми каналами[133] кальциевые потенциалы действия в дендритах, что приводит к значительному входу ионов кальция[132]. Во время генерации комплексных спайков простые спайки обычно подавлены[134, 135].

Клеточная активность в ядрах мозжечка

Тач и его коллеги[136, 137] изучали взаимоотношения между заученными движениями и клеточной активностью в глубоких ядрах мозжечка. Обезьян учили выполнять ряд последовательных сгибательных и разгибательных движений с нагрузкой. Изменяющийся груз служил для того, чтобы отделить мышечную активность, связанную с положением сустава, от активности, зависящей от направления движения. Клетки в ядрах мозжечка разряжались в трех вариантах: одни были активны при выполнении работы с нагрузкой, другие были активны при определенном положении сустава, третьи генерировали разряды при движении в определенном направлении.

Во время заученных движений клетки зубчатого ядра активировались раньше, чем клетки первичной моторной коры, затем после моторной коры следовала активность в промежуточном ядре мозжечка, а завершало процесс мышечное сокращение. Эта последовательность согласуется с идеей о том, что информация о планируемых движениях передается от ассоциативной моторной коры к латеральной доле мозжечка, где она обрабатывается и посылается обратно к первичной моторной коре через зубчатое ядро. Сигналы от моторной коры затем передаются к соответствующим спинальным мотонейронам, а также проходят через промежуточное ядро, где возможна поправка двигательной команды.

Идея о том, что зубчатое ядро играет роль в инициации планируемых действий, поддер-

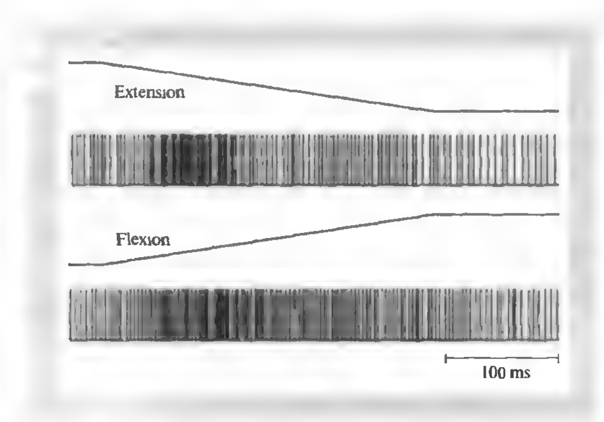


Рис. 22.25. Активность клетки промежуточного ядра мозжечка во время контролируемого зрением наклонного движения Обезьяна была обучена, сгибая или разгибая запястье, сопоставлять движение курсора на дисплее с положением рукоятки (см. рис. 22.20). Данная клетка реагирует на оба направления движения, увеличивая частоту разрядов как на сгибание, так и разгибание. Разряд является фазным, быстрым в начале движения и постепенно затухающим по частоте к моменту завершения движения. Данный нейрон снабжает информацией о временных характеристиках выполняемой команды, помогая, таким образом, формировать динамику движений запястья.

Fig. 22.25. Discharge Pattern of a Cell in the Interposed Nucleus of the cerebellum during a visually guided ramp movement. The monkey was trained to track a cursor on a visual display with the handle position, by flexing or extending the wrist (see Figure 22.20). The cell is bidirectional, increasing its firing rate on both flexion and extension. Discharge is phasic, rapid near the beginning of the movement and declining gradually in frequency as movement is completed. This neuron provides information on timing, helping to shape the dynamics of wrist movement. (After Thach, 1978.)

живается и другими экспериментами, в которых охлаждение этого ядра тормозило начало произвольного движения и появление соответствующей ему клеточной активности в двигательной коре[138]. Клетки Пуркинье средней части мозжечка, посылающие отростки к промежуточному ядру, получают проприоцептивный вход от мышц, участвуюших в движении, и поэтому могут модулировать выходной сигнал, проходящий через промежуточное ядро. Электрические разряды в этом ядре, зарегистрированные во время наклонных движений, совпадали с разрядами Ia афферентов в тех же экспериментальных условиях. Эти мозжечковые клетки разряжались особенно сильно в начале движения, причем как при сгибании, так и при разгибании (рис. 22.25). Более того, внешние толчки во время наклонных движений тут же отражались в активности как Ia афферентов, так и клеток промежуточного ядра. Исходя из этих и других экспериментов, было предположено, что одной из функций промежуточного ядра является отслеживание и контроль (посредством γ-мотонейронов) рефлексов с мышечных веретен. Такое регулирование помогает уменьшить вариации рефлекторной реакции, которые могут происходить во время медленных изменений длины мышцы. Это приводит к сглаживанию сокращения.

Итак, есть основания считать, что зубчатое ядро может играть важную роль в инициации, организации и исполнении планируемых движений, тогда как промежуточное ядро — в конечной регулировке рефлексов и движений, в частности, контроле над отклонениями от выполнения команды. Афферентные и эфферентные связи ядра шатра играют, вероятно, роль в контроле положения тела в пространстве[139]. Эксперименты, в которых синаптическая передача в том или другом ядре была блокирована локальной аппликацией химических агентов, подтверждают эту точку зрения. В зубчатом ядре такая аппликация вызывает задержку исполнения заученных движений, а блок передачи в промежуточном ядре вызывает постоянный тремор. Однако ни в том, ни в другом случае блокирование передачи *не устраняло* движение. Эффекты блокирования были гораздо более сильными при движениях с участием многих суставов. Блокирование ядра шатра нарушало способность сидеть, стоять, а также ходьбу; блокирование промежуточного ядра вызывало сильный тремор вытянутой руки; блокирование зубчатого ядра приводило к неправильному касанию мишеней и к дискоординации сложных движений пальцев рук.

Нарушения у пациентов с повреждениями мозжечка

Функциональная роль мозжечка во многом проясняется при анализе симптомов нарушений, регистрируемых у пациентов после повреждения этого органа. Например, медуллобластома, растущая по средней линии

на уровне четвертого желудочка, приводит сначала к нарушению баланса тела из-за давления на вестибулярные ядра мозжечка[140]. В общем, мозжечковые дисфункции характеризуются нарушениями координации движений. Локомоция сохраняется, но походка неустойчива, а ноги широко расставлены для компенсации нарушенного баланса. Проблемы возникают особенно явно при попытке быстрых переключений движений, что демонстрирует неспособность правильно начать и закончить движение. Классический неврологический тест заключается в просьбе пациенту быстро переместить палец с его носа на палец врача. Повреждения мозжечка проявляются в шаткой походке и промахивании мимо цели при попытке целенаправленного движения. Интенционный тремор появляется во время движения, но отсутствует в покое. Эти проблемы связаны, видимо, с отсутствием точного распределения во времени и нарушением баланса между активностью мышц-антагонистов.

Два типа двигательных заболеваний у пациентов (**мозжечковые атаксии**) — периодическая атаксия и спинномозжечковая атаксия (SCA) — ассоциированы с наследственными генетическими мутациями[141], часто ведущими к дегенерации клеток Пуркинье. Так же, как при болезни Хантингтона (см. следующий раздел), некоторые мутации, ассоциированые с SCA, приводят к дополнительному повтору триплета (CAG), кодирующего аминокислоту глютамин. Функции многих из пораженных генов неизвестны, но один из них (*SCA6*) вызывает CAG повторы в участке, кодирующем субъединицу α_{1A} кальциевого канала, которая экспрессируется в клетки Пуркинье мозжечка[142, 143]. Было показано, что другие мутации этого гена ассоциированы со 2 типом периодической атаксии, а также наследственной мигренью[144]. Периодическая атаксия 1-го типа ассоциирована с мутацией потенциалзависимого калиевого канала[145]. Так как оба типа каналов участвуют в генерации сложного спайка, то их мутации могут привести к накоплению ионов кальция в клетках Пуркинье и последующей гибели этих клеток.

Хотя проведенные недавно эксперименты дали ценную информацию о молекулярных и клеточных механизмах функций мозжечка и специфической роли отдельных ядер мозжечка в контроле движений и положения тела в пространстве, ясное заключение об общей функции мозжечка, данное Эдрианом более 50 лет назад, до сих пор кажется поразительным:

> *Несмотря на свое сходство с мозгом, мозжечок не имеет ничего общего с мыслительной работой... Мозжечок имеет гораздо более приземленную и совершенно бессознательную задачу сохранения баланса тела при движении конечностей, а также обеспечивает, чтобы конечности делали все, что от них требуется. Его работа показывает, что через механизмы нервной системы может быть реализовано множество процессов, задуманных сознанием. Если я решу поднять мою руку, сообщение отправится от двигательной зоны одного из полушарий мозга к спинному мозгу и дубликат этого сообщения пойдет в мозжечок. Там, в результате взаимодействия с другими сенсорными импульсами, в спинной мозг посылаются дополнительные приказы таким образом, что необходимые мышцы приводятся в действие точно в тот момент, когда им нужно, чтобы поднять мою руку и уберечь мое тело от падения. У мозжечка есть доступ ко всей информации от мышечных веретен и органов, реагирующих на давление, и поэтому он может вводить поправки для предотвращения сбоя команды и плохой координации. При повреждении мозжечка согласованность действий выходит из строя, мышцы сокращаются слишком рано или слишком поздно с неправильной силой. Работа системы должна быть тщательно рассчитанной, особенно с учетом того, что тело должно балансировать на двух ногах и использует руки для всех типов движения. Все это и выпалняется аппаратом нервной системы после того, как поступила сознательная команда. Мозжечок не имеет отношения к определению общего плана действий. Его удаление не повлияло бы на наши мысли и чувства, за исключением того, что мы будем осознавать, что наши конечности не находятся под нашим полным контролем, и должны будем планировать наши действия соответственно.*

§ 7. Базальные ганглии

Вблизи от дальних слоев коры больших полушарий головного мозга находятся группы нейронов, объединенных в крупные ядра, известные вместе как базальные ганглии. Они состоят из **хвостатого ядра** и **скорлупового ядра** (известных вместе как неостриатум), а также их наружной и внутренней части **бледного шара** (рис. 22.26). Две структуры среднего мозга — **черная субстанция** и **субталамическое ядро** — имеют афферентные и эфферентые связи с базальными ганглиями и часто рассматриваются

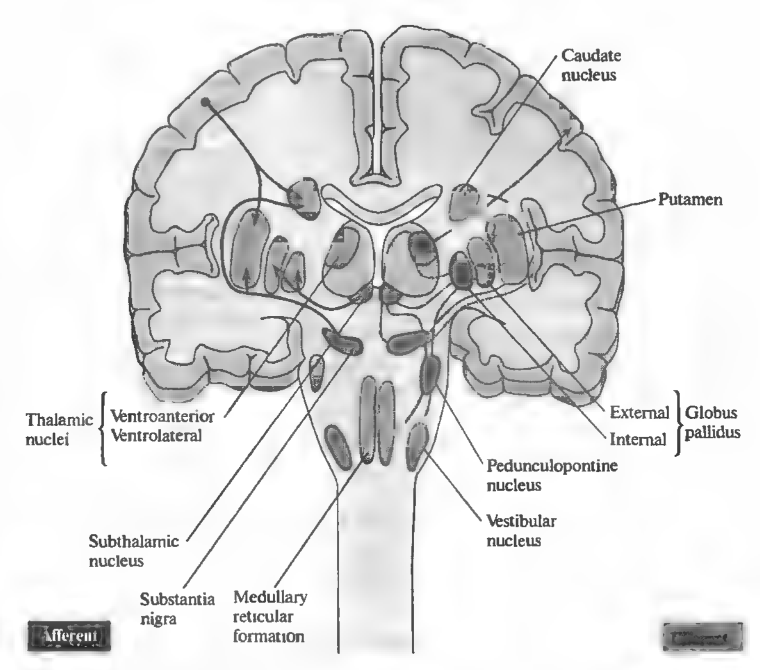


Рис. 22.26. Базальные ганглии. Срезы полушарий большого мозга, продолжающиеся в продольные стволы мозга и спинного мозга. Базальные ганглии включают хвостатое ядро, скорлупу и бледный шар. Два дополнительных ядра, черная субстанция и субталамическое ядро, связаны многочисленными связями с базальными ганглиями и порой рассматриваются как элементы одной системы. Преимущественным источником входов в базальные ганглии является кора. Выходящие волокна от базальных ганглиев направляются в переднее вентральное и вентролатеральное ядра таламуса, которые, в свою очередь, направляют отростки к коре, замыкая корковую обратную связь. Дополнительные эфферентные волокна направляются к вестибулярным ядрам и ретикулярной формации ствола мозга через ядра моста.

Fig. 22.26. The Basal Ganglia. Coronal section through the cerebral hemispheres, continuing to a longitudinal section of the brainstem and spinal cord. Basal ganglia include the caudate nucleus, putamen, and globus pallidus (external and internal divisions). Two additional nuclei, the substantia nigra and the subthalamic nucleus, interconnect extensively with the basal ganglia and are sometimes included with them. The predominant source of input to the basal ganglia is the cortex. Outputs from the basal ganglia go to the ventroanterior and ventrolateral nuclei of the thalamus, which in turn project to cortex, completing a cortical feedback circuit. Additional output pathways project to the vestibular nucleus and medullary reticular formation through the pedunculopontine nucleus.

как элементы той же системы. Дофаминергические нейроны черной субстанции (глава 14) направляют свои отростки в стриатум (нигростриальный тракт). Базальные ганглии получают множественные входы от коры мозга, в частности от прецентральной извилины. Их главные эфферентные пути идут в вентролатеральное и переднее вентральное ядро таламуса (совпадая с проекциями от мозжечка) и затем направляются в кору[146)]. Базальные ганглии обеспечивают существенную модуляцию выходящей двигательной команды через сложную систему обратных связей[147, 148)].

Нейронные сети базальных ганглиев

Хвостатое ядро и скорлупа функционируют вместе как «ворота» в базальные ганглии, получая глутаматергические возбуждающие входы из коры (рис. 22.27). Скорлупа получает входы от сенсорных и моторных областей, окружающих центральную борозду, поэтому его активность прямо связана с двигательной системой. Хвостатое ядро иннервируется фронтальной корой и поэтому оно вовлечено в когнитивные процессы высокого порядка. Параллельное поступление той и другой информации обеспечивает роль базальных ганглиев в сознательной деятельности, эмоциях, а также в выполнении двигательных команд[149, 150)].

ГАМК-ергические нейроны хвостатого ядра и скорлупы посылают свои волокна в бледный шар и ингибируют его активность. Нейроны бледного шара также относятся к числу тормозных, освобождая ГАМК в синапсах на нейронах таламуса в переднем вентральном и вентролатеральных ядрах. Нейроны бледного шара тонически активны, посылая до 50 потенциалов действия в секунду, что приво-

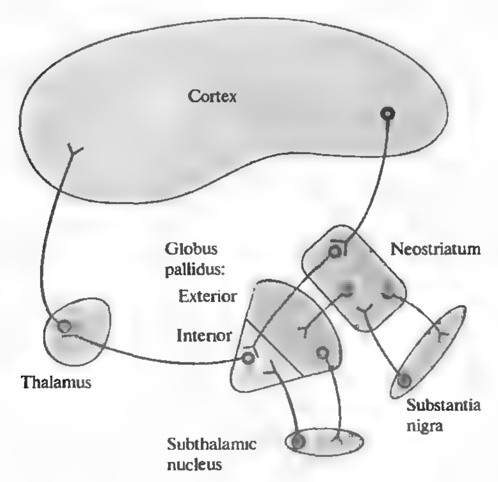


Рис. 22.27. Функциональные нейронные сети базальных ганглиев. Глутаматергические нейроны коры возбуждают ГАМК-ергические клетки неостриатума (хвостатое ядро и скорлупа). Нейроны стриатума направляются к наружной оболочке бледного шара (непрямой путь) и внутренней части бледного шара (прямой путь) для обеспечения торможения ГАМК-ергических нейронов в этих ядрах. ГАМК-ергические нейроны внутренней части бледного шара посылают тормозные отростки к таламусу. Дофаминергические нейроны черной субстанции обеспечивают обширное возбуждение стриатума. Глутаматергические нейроны субталамического ядра тормозятся отростками нейронов наружной оболочки бледного шара и возбуждают ГАМК-ергические нейроны внутреннего бледного шара.

Fig. 22.27. Functional Circuits of the Basal Ganglia. Glutamatergic neurons in cortex excite GABAergic cells of the neostriatum (caudate and putamen). Striatal neurons project to the external globus pallidus (the indirect pathway) and internal globus pallidus (the direct pathway) to inhibit GABAergic neurons in those nuclei. GABAergic neurons of the internal globus pallidus project to and inhibit the thalamus. Dopaminergic neurons of the substantia nigra produce net excitation of the striatum. Glutamatergic neurons of the subthalamic nucleus are inhibited by the projection from the external globus pallidus and excite GABAergic neurons of the internal globus pallidus. Excitatory neurons are shown in black, inhibitory neurons in grey.

дит к постоянному торможению прохождения возбуждения от таламуса к коре. Таким образом, повышенная активность коры возбуждает клетки хвостатого ядра и скорлупы, которые, в свою очередь, тормозят нейроны бледного шара и результатом является снятие торможения с таламуса. Базальные ганглии тормозят активность таламокортикального пути до тех пор, пока не поступит сигнал отмены.

Клеточная активность в базальных ганглиях

Минк и Тач[151, 152] исследовали поведение нервных клеток в бледном шаре обезьян во время различных движений, контролируемых зрением. Движения состояли в сгибании или разгибании кисти с различной нагрузкой, во многих случаях в движении участвовала только одна мышечная группа. Обезьян заставляли отслеживать световым пятном движение курсора на экране. Разряды клеток были относительно нечувствительными к исходному положению кисти, скорости движения или величине нагрузки. Однако электрическая активность уменьшалась или увеличивалась по мере совершения движения. Так, клетки бледного шара изменяли активность во время внезапных движений. Это происходило вслед за повышением активности в зубчатом ядре и возникало часто уже после начала электрической активности в соответствующих мышцах.

Минк и Тач предположили, что разряды клеток бледного шара ассоциированы с освобождением от удерживающего механизма, ответственного за фиксацию суставов, разрешая таким образом начало движения. Аналогия с началом движения машины, находящейся на склоне, может объяснить причину задержанной нейрональной активности: действительно, в этом случае ручной тормоз может быть отпущен только тогда, когда нажат газ. В согласии с этим выводом находится наблюдение о том, что инъекция мусцимола (агонист ГАМК рецепторов, см. главу 13), приводящая к торможению нейронов в бледном шаре, вызывает повышение тонуса мышц кисти за счет совместного сокращения сгибателей и разгибателей[153]. При этом заученные движения были замедлены без существенных изменений в моменте начала движения.

Болезни базальных ганглиев

Важность базальных ганглиев в моторном контроле подчеркивается широким распространением нейродегенеративных болезней, которые связаны с нарушением этих образований[154, 155]. Так, в 1817 году Джеймсом Паркинсоном был описан «дрожательный паралич». **Болезнь Паркинсона** характеризуется тремором покоя, который проходит во время произвольных движений, увеличенным тонусом из-за совместной активации мышц-антагонистов, затрудненным началом движения

и медленным ходом выполнения движения[156]. При этом дегенерированы дофаминергические нейроны черной субстанции. Замещение дофамина путем введения его предшественника L-ДОФА, является стандартной терапией.

Нейроны черной субстанции освобождают дофамин из окончаний в неостриатуме, тормозя одни нейроны и активируя другие, с преобладанием, в целом, возбуждающего эффекта[157]. Так, при дефиците дофамина при болезни Паркинсона происходит снижение активности стриатума и он вызывает меньшее торможение бледного шара. Увеличение активности бледного шара уменьшает активность клеток таламуса, что, в свою очередь, уменьшает возбуждающий поток импульсов в моторную кору. Результатом является симптом гипокинезии, один из наиболее ярких при этой болезни.

Другое хорошо известное заболевание базальных ганглиев называется **болезнью Хантингтона**, при которой ярко проявляется гиперкинез в виде генерации спонтанных непроизвольных движений, которые дали болезни другое название — хорея Хантингтона (от греческого слова chorea — танец). При этой болезни дегенерируют нейроны стриатума, предназначенные тормозить клетки наружной части бледного шара. Эти паллидарные нейроны в норме ингибируют субталамическое ядро, которое, в свою очередь, возбуждает через обратную связь эфферентные пути бледного шара. После потери тормозного контроля со стороны стриатума субталамическое ядро перестает возбуждать бледный шар (рис. 22.27). Это приводит к тому, что торможение таламуса бледным шаром снижается, приводя к ненормальной активации моторной коры таламусом — гиперкинезу[158]. Эта интерпретация поддерживается сходным проявлением состояния, названного **гемибаллизм**, который наблюдается тогда, когда субталамическое ядро повреждается инфарктом задней церебральной артерии. После этого повреждения наблюдаются разболтанные движения рук и ног на противоположной стороне тела, вновь как результат сниженного торможения со стороны бледного шара.

Болезнь Хантингтона детерминирована генетически[159, 160]. Сравнительный анализ в семьях, имеющих больных этой болезнью, позволил клонировать мутированный ген. Оказалось, что у больных имеется повторение CAG триплета (кодирующего глютамин) от 40 до 121 раза (в норме повторение не превышает 34 раз)[161]. Большее число повторов триплета кореллирует с более ранним началом заболевания (обычно к концу среднего возраста). Белок, кодируемый геном болезни Хантингтона, является крупным, превышающим 3 000 аминокислот, его функция остается неизвестной[162].

Выводы

- Двигательная (нейромоторная) единица представляет собой мотонейрон и иннервируемые им мышечные волокна.
- Афференты мышечных веретен подвержены дивергенции в спинном мозге, образуя слабые синаптические контакты на всех мотонейронах, управляющих данной мышцей. Пространственная и временная суммация импульсов от мышечных веретен позволяет афферентному потоку достигнуть порога возбуждения.
- Мышечное сокращение начинается с небольших моторных единиц и впоследствии вовлекает крупные двигательные единицы (принцип размера), поскольку в ответ на тот же раздражитель малые мотонейроны более возбудимы.
- Рецепторы растяжения активируют мышцы-агонисты и через интернейроны ингибируют мышцы-антагонисты.
- Сухожильные органы Гольджи чувствительны к напряжению мышцы и ингибируют мотонейроны через интернейроны.
- Чувствительность мышечных веретен к растяжению модулируется активацией γ-мотонейронов (фузимоторных), которые вызывают сокращение интрафузальных мышечных волокон. Ко-активация α- и γ-мотонейронов непрерывно подстраивает чувствительность веретен во время запрограммированных движений.
- Сгибательный и перекрестный-разгибательный рефлексы, инициируемые болевым раздражителем, являются свидетельством координации движений конечностей, что является необходимым компонентом локомоции.
- Медиальная и латеральная группы спинальных мотонейронов иннервируют, соответственно, мышцы туловища и дистальных конечностей.
- Пейсмекерные нейроны и синаптические взаимодействия нервных клеток совмест-

но обеспечивают формирование центральных генераторов ритма, управляющих врожденными двигательными программами, такими как локомоция и дыхание.

- Центральные двигательные команды могут запускаться и непрерывно модулироваться обратным сенсорным притоком.
- Дыхание представляет собой пример моторной программы, управляемой генератором ритма в стволе мозга, который модулируется уровнем CO_2 крови и рецепторами растяжения в дыхательных мышцах.
- Первичная двигательная кора M_1 располагается впереди центральной борозды, со соматотопическим представлением мышц тела. Кортикоспинальные нейроны, направляющиеся в спинной мозг, посылают импульсный поток, интенсивность которого пропорциональна силе мышечного сокращения.
- Многие нейроны в M_1 зоне являются детерминироваными в отношении направления движения. Их активность зависит от стартовой позиции конечности и характера инициирующего движение сигнала.
- Мозжечок помогает планированию и исполнению двигательных команд благодаря обратной связи с корой и в результате нисходящих команд к красному ядру и ядрам ствола мозга. Разрушение мозжечка нарушает координацию без изменений в сенсорной сфере и в силе мышечных сокращений.
- Базальные ганглии обеспечивают отрицательную обратную связь с корой и действуют, ограничивая число выходящих двигательных команд. Последствия нарушений функций базальных ганглиев демонстрируют весьма сложный характер этих обратных связей.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Arshavsky, Y. I., Deliagina, T. G., and Orlovsky, G. N. 1997. Pattern generation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 781–789.
- Asanuma, H. 1989. *The Motor Cortex*. Raven, New York.
- Georgopoulos, A. P. 1994. New concepts in generation of movement. *Neuron* 13: 257–268.
- Getting, P. A. 1989. Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 185–204.
- Kiehn, O., et al. (eds.) 1998. *Neuronal Mechanisms for Generating Locomotor Activity* (Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 860). New York Academy of Sciences, New York. [22]
- Klockgether, T., and Evert, B. 1998. Genes involved in hereditary ataxias. *Trends Neurosci.* 21: 413–418.
- Paulson, H. L., and Fischbeck, K. H. 1996. Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 79–107.
- Penfield, W., and Rasmussen, T. 1950. *The Cerebral Cortex of Man: A Clinical Study of Localization of Function*. Macmillan, New York.
- Rekling, J. C., and Feldman, J. L. 1998. PreBotzinger complex and pacemaker neurons: Hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Ann. Rev. Physiol.* 60: 385–405.
- Thach, W. T., Goodkin, H. G., and Keating, J. G. 1992. The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu. Rev. Neurosci.* 15: 403–442.
- Wichmann, T., and DeLong, M. R. 1996. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 751–758.

Статьи

- Henneman, E., Somjen, G., and Carpenter, D. O. 1965. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 28: 560–580.
- Kami, A., Meyer, G., Jezzard, P., Adams, M. M., Turner, R., and Ungerleider, L. G. 1995. Functional MRI evidence for adult motor cortex plasticity during motor skill learning. *Nature* 377: 155–158.
- Lang, E. J., Sugihara, I., Welsh, J. P., and Llinas, R. R. 1999. Patterns of spontaneous Purkinje cell complex spike activity in the awake rat. *J. Neurosci.* 19: 2728–2739.
- Meyer-Lohmann, J., Hore, J., and Brooks, V. B. 1977. Cerebellar participation in generation of prompt arm movements. *J. Neurophysiol.* 40: 1038–1050.
- Mink, J. W. and Thach, W. T. 1991a. Basal ganglia motor control. I. Nonexclusive relation of palhdal discharge to five movement modes. *J. Neurophysiol.* 65: 273–300.
- Salinas, E. and Romo, R. 1998. Conversion of sensory signals into motor commands in primary motor cortex. *J. Neurosci.* 18: 499–511.

- Sherrington, C. S. 1910. Flexor reflex of the limb, crossed extension reflex, and reflex stepping and standing (cat and dog). *J. Physiol.* 40: 28–121.
- Thach, W. T. 1978. Correlation of neural discharge with pattern and force of muscular activity, joint position, and direction of next intended movement in motor cortex and cerebellum *J. Neurophysiol.* 41: 654–676.

Цитированная литература

1. Adrian, E. D. 1959. *The Mechanism of Nervous Action.* University of Pennsylvania Press, Philadelphia.
2. Brannstrom, T. 1993. *J. Comp. Neurol.* 330: 439–454.
3. Lloyd, D. P. C. 1943. *J. Neurophysiol.* 6: 317–326.
4. Mendell, L. M., and Henneman, E. 1971. *J. Neurophysiol.* 34: 171–187.
5. Lucas, S. M., and Binder, M. D. 1984. *J. Neurophysiol.* 51: 50–63.
6. Brown, A. G., and Fyffe, R. E. W. 1982. *J. Physiol.* 313: 121–140.
7. Burke, R. E., and Glenn, L. L. 1996. *J. Comp. Neurol.* 372: 465–485.
8. Kuno, M. 1971. *Physiol. Rev.* 51: 647–678.
9. Kirkwood, P. A., and Sears, T. A. 1982. *J. Physiol.* 322: 287–314.
10. Honig, M. C., Collins, W. F., and Mendell, L. 1983. *J. Neurophysiol.* 49: 886–901.
11. Henneman, E., Somjen, G., and Carpenter, D. O. 1965. *J. Neurophysiol.* 28: 560–580.
12. Bawa, P., and Lemon, R. N. 1993. *J. Physiol.* 471: 445–464.
13. Rossi, A., Zalaffi, A., and Decchi, B. 1996. *Brain Res.* 714: 76–86.
14. Schmied, A., et al. 1997. *Exp. Brain Res.* 113: 214–229.
15. Kirkwood, P. A., and Sears, T. A. 1974. *Nature* 252: 243–244.
16. Lundberg, A. 1979. *Prog. Brain Res.* 50: 11–28.
17. Jankowska, E., and Riddell, J. S. 1995. *J. Physiol.* 483: 461–471.
18. Gladden, M. H., Jankowska, E., and Czarkowska-Bauch, J. 1998. *J. Physiol.* 512: 507–520.
19. Crago, P. E., Houk, J. C., and Rymer, W. Z. 1982. *J. Neurophysiol.* 47: 1069–1083.
20. Fukami, T. 1982. *J. Neurophysiol.* 47: 810–846.
21. Matthews, P. B. C. 1972. *Mammalian Muscle Receptors and Their Central Action.* Edward Arnold, London.
22. Gossard, J. P., et al. 1994. *Exp. Broin Res.* 98: 213–228.
23. Walro, J. M., and Kucera, J, 1999. *Trends Neurosci.* 22: 180–184.
24. Eccles, J. C., and Sherrington, C. S. 1930. *Proc. R. Soc. Lond. B* 106: 326–357.
25. Leksell, L. 1945. *Acta Physiol. Scand.* 10 (Suppl. 31): 1–84.
26. Kuffler, S. W., Hunt, C. C., and Quilliam, J. P. 1951. *J. Neurophysiol.* 14: 29–51.
27. Sears, T. A. 1964. *J. Physiol.* 174: 295–315.
28. Critchlow, V., and von Euler, C. 1963. *J. Physiol.* 168: 820–847.
29. Greer, J. J., and Stein, R. B. 1990. *J. Physiol.* 422: 245–264.
30. Vallbo, A. B. 1990. *J. Neurophysiol.* 63: 1307–1313.
31. Sherrington, C. S. 1910. *J. Physiol.* 40: 28–121.
32. Kiehn, O., et al. (eds.). 1998. *Neuronal Mechanisms for Generating Locomotor Activity.* New York Academy of Sciences, New York.
33. Smith, S. J., and Thompson, S. H. 1987. *J. Physiol.* 382: 425–448.
34. Baro, D. J., et al. 1997. *J. Neurosci.* 17: 6597–6610.
35. Michel, S., et al. 1993. *Science* 259: 239–241.
36. Cazalets, J. R., Borde, M., and Clarac, F. 1996. *J. Neurosci.* 16: 298–306.
37. Kremer, E., and Lev-Tov, A. 1997. *J. Neurophysiol.* 77: 1155–1170.
38. Bracci, E., Beato, M., and Nistri, A. 1998. J. Neurophysiol. 79: 2643–2652.
39. Ballerini, L., et al. 1999. *J. Physiol.* 517: 459–475.
40. Getting, P. A. 1989. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 185–204.
41. Arshavsky, Y. I., Deliagina, T. G., and Orlovsky, G. N. 1997. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 781–789.
42. Pearson, K. 1976. *Sci. Am.* 235(6): 72–86.
43. Bekoff, A. 1992. *J. Neurobiol.* 23: 1486–1505.
44. Robinson, S. R., and Smotherman, W. P. 1992. *J. Neurobiol.* 23: 1574–1600.
45. Brown, T. G. 1911. *Proc. R. Soc. Lond. B* 84: 308–319.
46. Grillner, S. 1975. *Physiol. Rev.* 55: 247–304.
47. Chau, C., Barbeau, H., and Rossignol, S. 1998. *J. Neurophysiol.* 79: 2941–2963.
48. De Leon, R. D., et al. 1998. *J. Neurophysiol.* 79: 1329–1340.
49. Wernig, A., et al. 1995. *Eur. J. Neurosci.* 7: 823–829.
50. Pearson, K. G., and Iles, J. F. 1970. *J. Exp. Biol.* 52: 139–165.
51. Grillner, S., Wallen, P., and Brodin, L. 1991. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 169–199.
52. Grillner, S., Parker, D., and el Manira, A. 1998. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 860: 1–18.

53. Guertin, P. A., and Hounsgaard, J. 1998. *Neurosci. Lett.* 245: 5–8.
54. Stein, P. S., McCullough, M. L., and Currie, S. N. 1998. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 860: 142–154.
55. Marsden, C. D., Rothwell, J. C., and Day, B. L. 1984. *Trends Neurosci.* 7: 253–257.
56. Sakamoto, T., Arissan, K., and Asanuma, H. 1989. *Brain Res.* 503: 258–264.
57. Pearson, K. G., Ramirez, J. M., and Jiang, W. 1992. *Exp. Brain Res.* 90: 557–566.
58. Pearson, K. G., Misiaszek, J. E., and Fouad, K. 1998. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 860: 203–215.
59. Da Silva, K. M. C., et al. 1977. *J. Physiol.* 266: 499–521.
60. Sears, T. A. 1964. *J. Physiol.* 175: 404–424.
61. Hilaire, G. G., Nicholls, J. G., and Sears, T. A. 1983. *J. Physiol.* 342: 527–548.
62. Nicholls, J. G., et al. 1990. *J. Exp. Biol.* 152: 1–15.
63. Smith, J. C., et al. 1991. *Science* 254: 726–729.
64. Rekling, J. C., and Feldman, J. L. 1998. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 385–405.
65. Onimaru, H. 1995. *Neurosci. Res.* 21: 183–190.
66. Bainton, C. R., Kirkwood, P. A., and Sears, T. A. 1978. *J. Physiol.* 280: 249–272.
67. Bruce, E. N., and Cherniak, N. S. 1987. *J. Appl. Physiol.* 62: 389–402.
68. Eugenin, J., and Nicholls, J. G. 1997. *J. Physiol.* 501: 425–437.
69. Crosby, E. C., Humphrey, T., and Lauer, E. W. 1966. *Correlative Anatomy of the Nervous System.* Macmillan, New York.
70. Kuypers, H. G. J. M. 1981. In *Handbook of Physiology*, Section 1: The Nervous System, Vol. 2: *Motor Control*, Part 2. American Physiological Society, Bethesda, MD.
71. Biber, M. P., Kneisley, L. W., and LaVail, J. H. 1978. *Exp. Neurol.* 59: 492–508.
72. Cheney, D. P., and Fetz, E. E. 1980. *J. Neurophysiol.* 44: 773–791.
73. Rouiller, E. M., et al. 1996. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1055–1059.
74. Lawrence, D. G., and Kuypers, H. G. J. M. 1968. *Brain* 91: 1–14.
75. Hepp-Reymond, M. C. 1988. In *Comparative Primate Biology*, Vol. 4. Liss, New York, pp. 501–624.
76. Fujito, Y., and Aoki, M. 1995. *Exp. Brain Res.* 105: 181–190.
77. Kennedy, P. R. 1990. *Trends Neurosci.* 13: 474–479.
78. Pettersson, L. G., et al. 1997. *Neurosci. Res.* 29: 241–256.
79. Kaspar, J., Schor, R. H., and Wilson, V. J. 1988. *J. Neurophysiol.* 60: 1765–1768.
80. Jones, E. G., and Wise, S. P. 1977. *J. Comp. Neurol.* 175: 391–438.
81. Porter, L. L., and Sakamoto, K. 1988. *J. Comp. Neurol.* 271: 387–396.
82. Kaneko, T., Caria, M. A., and Asanuma, H. 1994. *J. Comp. Neurol.* 345: 172–184.
83. Fritsch, G., and Hitzig, E. 1870. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.* 37: 300–332.
84. Penfield, W., and Rasmussen, T. 1950. *The Cerebral Cortex of Man: A Clinical Study of Localization of Function.* Macmillan, New York.
85. Rao, S. M., et al. 1995. *Neurology* 45: 919–924.
86. Sanes, J. N., Suner, S., and Donoghue, J. P. 1990. *Exp. Brain Res.* 79: 479–491.
87. Karni, A., et al. 1995. *Nature* 377: 155–158.
88. Nudo, R. J., et al. 1996. *J. Neurosci.* 16: 785–807.
89. Classen, J., et al. 1998. *J. Neurophysiol.* 79: 1117–1123.
90. Asanuma, H., and Pavlides, C. 1997. *Neuroreport* 8: 1–4.
91. Mitz, A. R., and Wise, S. P. 1987. *J. Neurosci.* 7: 1010–1021.
92. Preuss, T. M., Stepniewska, I., and Kaas, J. H. 1996. *J. Comp. Neurol.* 371: 649–676.
93. Fink, G. R., et al. 1997. *J. Neurophysiol.* 77: 2164–2174.
94. Georgopoulos, A. P. 1991. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 361–377.
95. Donoghue, J. P., and Sanes, J. N. 1994. *J. Clin. Neurophysiol.* 11: 382–396.
96. Rizzolatti, G., Luppino, G., and Matelli, M. 1998. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 106: 283–296.
97. Adrian, E. D. 1946. *The Physical Background of Perception.* Clarendon, Oxford, England.
98. Rijntjes, M., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 8043–8048.
99. Picard, N., and Strick, P. L. 1996. *Cerebral Cortex* 6: 342–353.
100. Devinsky, O., Morrell, M. J., and Vogt, B. A. 1995. *Brain* 118: 279–306.
101. Shima, K., and Tanji, J. 1998. *Science* 282: 1335–1338.
102. Evarts, E. V. 1965. *J. Neurophysiol.* 28: 216–228.
103. Evarts, E. V. 1966. *J. Neurophysiol.* 29: 1011–1027.
104. Evarts, E. V. 1968. *J. Neurophysiol.* 31: 14–27.
105. Humphrey, D. R., and Reed, D. J. 1983. *Adv. Neurol.* 39: 347–372.
106. Schwartz, A. B., Kettner, R. E., and Georgopoulos, A. P. 1988. *J. Neurosci.* 8: 2913–2927.
107. Caminiti, R., Johnson, P. B., and Urbano, A. 1990. *J. Neurosci.* 10: 2039–2058.
108. Scott, S. H., and Kalaska, J. F. 1995. *J. Neurophysiol.* 73: 2563–2567.
109. Georgopoulos, A. P., Taira, M., and Lukashin, A. 1993. *Science* 260: 47–52.
110. Georgopoulos, A. P., Schwartz, A. B. and Kettner R. E. 1986. *Science* 233: 1416–1419.

111. Georgopolous, A. P., Kettner, R. E., and Schwartz, A. B. 1988. *J. Neurosci.* 8: 2928–2937.
112. Georgopoulos, A. P. 1994. *Neuron* 13: 257–268.
113. Groh, J. H., Born, R. T., and Newsome, W. T. 1997. *J. Neurosci.* 17: 4312–4330.
114. Shen, L., and Alexander, G. E. 1997. *J. Neurophysiol.* 77: 1171–1194.
115. Mountcastle, V. B., Atluri, P. P., and Romo, R. 1992. *Cerebral Cortex* 2: 277–294.
116. Salinas, E., and Romo, R. 1998. *J. Neurosci.* 18: 499–511.
117. Mountcastle, V. B. 1995. *Cerebral Cortex* 5: 377–390.
118. Rizzolatti, G., Fogassi, L., and Gallese, V. 1997. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 562–567.
119. De Renzi, E. 1982. *Disorders of Space Exploration and Cognition.* Wiley, New York.
120. Halligan, P. W., and Marshall, J. C. 1991. *Nature* 350: 498–500.
121. Kalaska, J. F., et al. 1997. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 849–859.
122. Nieuwenhuys, R., Donkelaar, H. J., and Nicholson, C. 1998. *The Central Nervous System of Vertebrates.* Springer, New York.
123. Thach, W. T. 1998. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70: 177–188.
124. Schmahmann, J. D., and Sherman, J. C. 1998. *Brain* 121: 561–579.
125. Wylie, D. R., et al. 1994. *J. Comp. Neurol.* 349: 448–463.
126. Tan, J., Epema, A. H., and Voogd, J. 1995. *J. Comp. Neurol.* 356: 51–71.
127. Llinás, R. R. 1975. *Sci. Am.* 232(1): 56–71.
128. Ito, M. 1984. *The Cerebellum and Neural Control.* Raven, New York.
129. Martinez, F. E., Crill, W. E., and Kennedy, T. T. 1971. *J. Neurophysiol.* 34: 348–356.
130. Ito, M., and Simpson, J. I. 1971. *Broin Res.* 31: 215–219.
131. Konnerth, A., Llano, I., and Armstrong, C. M. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2662–2665.
132. Miyakawa, H., et al. 1992. *J. Neurophysiol.* 68: 1178–1189.
133. Midtgaard, J., Lasser-Ross, N., and Ross, W. N. 1993. *J. Neurophysiol.* 70: 2455–2469.
134. Welsh, J. P., and Llinás, R. R. 1997. *Prog. Brain Res.* 114: 449–461.
135. Lang, E. J., et al. 1999. *J. Neurosci.* 19: 2728–2739.
136. Thach, W. T. 1978. *J. Neurophysiol.* 41: 654–676.
137. Schreiber, M. H., and Thach, W. T., Jr. 1985. *J. Neurophysiol.* 54: 1228–1270.
138. Meyer-Lohmann, J., Hore, J., and Brooks, V. B. 1977. *J. Neurophysiol.* 40: 1038–1050.
139. Thach, W. T., Goodkin, H. G., and Keating, J. G. 1992. *Annu. Rev. Neurosci.* 15: 403–442.
140. Holmes, G. 1939. *Brain* 62: 1–30.
141. Klockgether, T., and Evert, B. 1998. *Trends Neurosci.* 21: 413–418.
142. Zhuchenko, O., et al. 1997. *Nature Genet.* 15: 62–69.
143. Ludwig, A., Flockerzi, V., and Hofmann, F. 1997. *J. Neurosci.* 17: 1339–1349.
144. Ophoff, R. A., et al. 1996. *Cell* 87: 543–552.
145. Browne, D. L., et al. 1994. *Nature Genet.* 8: 136–140.
146. Hoover, J. E., and Strick, P. L. 1999. *J. Neurosci.* 19: 1446–1463.
147. Mink, J. W., and Thach, W. T. 1993. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 950–957.
148. Graybiel, A. M., et al. 1994. *Science* 265: 1826–1831.
149. Alexander, G. E., DeLong, M. R., and Strick, P. L. 1986. *Annu. Rev. Neurosci.* 9: 357–381.
150. Brown, L. L., Schneider, J. S., and Lidsky, T. I. 1997. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 157–163.
151. Mink, J. W., and Thach, W. T. 1991. *J. Neurophysiol.* 65: 273–300.
152. Mink, J. W., and Thach, W. T. 1991. *J. Neurophysiol.* 65: 301–329.
153. Mink, J. W., and Thach, W. T. 1991. *J. Neurophysiol.* 65: 330–351.
154. Albin, R. L., Young, A. B., and Penney, J. B. 1995. *Trends Neurosci.* 18: 63–64.
155. Wichmann, T., and DeLong, M. R. 1996. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 751–758.
156. Olanow, C. W., and Tatton, W. G. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 123–144.
157. Gerfen, C. R. 1995. *Clin. Neuropharmacol.* 18: 162–177.
158. Albin, R. L. 1995. *Parkinsonism Rel. Disord.* 1: 3–11.
159. Reddy, P. H., Williams, M., and Tagle, D. A. 1999. *Trends Neurosci.* 22: 248–255.
160. Paulson, H. L., and Fischbeck, K. H. 1996. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 79–107.
161. Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. *Cell* 72: 971–983.
162. Gusella, J. F., and MacDonald, M. E. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 425–430.

Раздел IV

РАЗВИТИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Глава 23

Развитие нервной системы

Нервные клетки приобретают свои уникальные свойства и образуют четко организованные и удивительно точные синаптические связи во время развития под влиянием генетических факторов и факторов среды. Такими факторами являются: происхождение клеток; индукционные и трофические взаимодействия между клетками; метки, благодаря которым осуществляются миграция и рост аксонов; специфические маркеры, при помощи которых клетки узнают друг друга, а также постоянная реорганизация связей в зависимости от активности клетки.

Развитие нервной системы позвоночных начинается с формирования нервной пластинки из дорзальной эктодермы. Нервная пластинка затем сворачивается, формируя нервную трубку и нервный гребень. Нейроны и глиальные клетки в ЦНС образуются в результате деления клеток-предшественников вентрикулярной зоны нервной трубки. Постмитотические нейроны мигрируют от вентрикулярной поверхности нервной трубки и образуют серое вещество НС взрослых позвоночных. В пределах каждой из областей в развивающейся нервной системе судьба клеток в значительной степени зависит от их расположения. Недавно появилась возможность установить механизмы развития мозга на молекулярном уровне, что позволило объяснить такие механизмы, как рострокаудальный и дорзовентральный паттерны развития, которые до этого были описаны только феноменологически, без каких либо идей о механизмах. Например, экспрессия серии гомеобоксных генов вдоль рострокаудальной оси способствует дифференцировке сегментов заднего мозга; дорзовентральный паттерн определяется отчасти градиентом протеина, известного как Sonic hedgehog.

Клетки нервного гребня образуют периферическую нервную систему. Фенотип, в который дифференцируются клетки нервного гребня, определяется сигналами, поступающими от соседних клеток. Таким образом, если клетки нервного гребня были пересажены в раннем возрасте, они будут дифференцироваться в соответствии со своим новым расположением.

Для установления синаптических контактов со своими мишенями, нейроны образуют аксоны, имеющие на концах конусы роста, которыми они исследуют окружающее пространство. Было идентифицировано два класса молекул, играющих важную роль в продвижении конусов роста: молекулы клеточной адгезии надсемейства иммуноглобулинов и молекулы адгезии внеклеточного матрикса. Навигация конуса роста контролируется при помощи аттрактантов и репеллентов, действующих на коротких и длинных дистанциях. Хемоаттрактанты управляют ростом аксона либо до конечной, либо до промежуточной цели, например до клетки-ориентира (guidepost cell). Хеморепелленты не допускают вторжения аксонов в определенные «неблагоприятные» зоны. Проекции аксонов во время развития зачастую более сильно развиты, чем таковые у взрослых, у которых осуществляется усечение связей на основе механизмов, связанных с активностью и трофическими факторами.

Функциональные синаптические контакты формируются быстро, однако сначала они не имеют характерной специализации, свойственной синапсам взрослых. Только по прошествии нескольких недель синапсы созревают и приобретают свойства синапсов взрослых.

Характерной чертой развития центральной нервной системы всех позвоночных является первоначальное образование избыточного количества нейронов, часть из которых в дальнейшем погибает. Гибель нейронов регулируется при помощи конкуренции за трофические факторы. Фактор роста нерва является представителем семейства протеинов (нейротрофинов, neurotrophins), которые способны поддерживать активность определенных популяций нейронов.

Упорядоченность связей, образованных нервными клетками между собой, а также между ними и другими тканями на периферии является одним из условий для нормального функционирования нервной системы. Для создания такой точной нервной архитектуры во время развития необходимо, чтобы сформировались нейроны определенных типов в необходимом количестве и в строго определенных местах нервной системы, которые затем должны образовать связи со своими уникальными клетками-мишенями. Например, чтобы работал рефлекс растяжения, необходимо, чтобы афферентный сенсорный нейрон типа Ia спинномозгового ганглия послал свой аксон к определенному месту в области мышечного веретена, а другой аксон, идущий в ЦНС, должен образовать синаптический контакт исключительно с тем мотонейроном, который иннервирует мышцу, где находится это мышечное веретено. Другие веточки этого центрального аксона заканчиваются на спинальных интернейронах или уходят в дорзальные столбы для иннервации клеток, расположенных в ядрах спинного мозга. Кроме того, количество сенсорных и моторных нейронов должно находиться в определенном соотношении в зависимости от размеров мышцы и количества мышечных веретен, которые эта мышца содержит.

Большой спектр вопросов возникает при рассмотрении данного примера. Каким образом клетки дифференцируются в нейроны или клетки глии? По каким меткам следует нейрон, мигрируя к своему месторасположению? Какие клеточные механизмы позволяют нейрону направлять свой аксон строго к определенной цели, одной из мириада возможных, чтобы образовать на ней синапс? В поиске ответов на эти вопросы мы вспоминаем, что в нервной системе имеется 10^{10}–10^{12} нервных клеток, причудливо связанных друг с другом, при этом количество генов, которые могут определять эту структуру, составляет всего 10^5 или около того. Более того, ЦНС демонстрирует большую гибкость во время критических периодов развития и даже у взрослых, у которых образуются новые синапсы, а старые либо изменяют свои свойства, либо просто исчезают, — и все это как результат изменения активности клеток (глава 25).

Спектр проблем, относящихся к развитию, образованию синапсов, нервной специфичности и изменению свойств связей, настолько широк, что дать их полный обзор не представляется возможным. Многие аспекты этого уже подробно освещены в других руководствах[1, 2]. В этой главе мы осуществим короткий экскурс в нейроэмбриологию и опишем отдельные экспериментальные подходы к вопросам развития нервной системы. Темы будут освещаться нами в том порядке, как происходит процесс развития НС: начиная с нейроэктодермы и раннего морфогенеза нервной системы, затем мы рассмотрим региональную спецификацию нервной ткани и факторы, которые определяют идентификацию отдельных нейронов и клеток глии, и в конце мы поговорим о механизмах роста аксонов, иннервации ими определенной цели, образовании синапсов, а также о роли факторов роста и конкуренции в окончательном формировании нервной системы.

Терминология

Основная терминологическая проблема возникает при изучении развития на молекулярном уровне. В последние годы описывается все больше и больше молекул, для которых известен механизм их действия. Сюда относятся также белки и гены, важные для выживания клетки, ее роста и дифференцировки, для формирования аксона и его навигации, для образования синапса и управления его свойствами. Для того, чтобы еще больше усложнить ситуацию, большинство этих белков и генов получили своеобразные имена, связанные с историей их открытия или благодаря выдумке их первооткрывателей в лабо-

раториях, где впервые описывались их свойства. В результате этого читатель (который уже должен был познакомиться с таким чужеродным понятием, как «замедленное выпрямление» (delayed rectification) из нашей дискуссии о передаче сигнала, сейчас вынужден привыкать к серии новых необычных названий, таких как "Sonic hedgehog" («звучащий ежик») и эфрин ("Ephrin"), а также к бесконечному числу сокращений, типа "N-CAM", "BDNF" и "Elf-2", ни одно из которых непосредственно не говорит о функции того или иного агента. Мы постарались представить здесь минимальное количество генов и белков и, где возможно, использовать их полные имена.

Генетические подходы к пониманию процесса развития

Основные достижения последних лет привели к значительному скачку в нашем понимании молекулярных механизмов тех процессов и явлений, которые ранее были только констатированы. Первым достижением является разработка новых молекулярных биотехнологий для контроля и управления экспрессией генов. Вторым является открытие механизмов и молекул, которые управляют развитием нервной системы удивительно сходным образом у различных животных. Например, как мы уже упоминали в главе 1, гены, которые управляют развитием глаза у развивающегося цыпленка, мышонка или человека очень сходны с генами, определяющими формирование глаза дрозофилы[3]. Таким образом, гены, определяющие развитие дрозофилы, грибов-дрожжей и нематод (*C. elegans*), часто имеют гомологов среди генов, определяющих развитие позвоночных. Третьим достижением является использование полосатой коралловой рыбы (zebra fish, официальное русское название «полосатый данио», *Brachydanio rerio*), впервые предложенной Страйзингером[4], как особенно удачного объекта для изучения развития позвоночных[5]. Эмбрион полосатого данио прозрачен, что позволяет непосредственно наблюдать за отдельными клетками во время эмбриогенеза, который у данио происходит довольно быстро. Наиболее важным является то, что были разработаны приемы, при помощи которых у данио могут быть вызваны, контролированы и поддержаны на определенном уровне направленные мутации, что открывает дорогу к обнаружению важных генов позвоночных, которые могут иметь гомологов у некоторых видов более просто устроенных беспозвоночных[6].

§ 1. Развитие нервной системы в раннем периоде

В раннем периоде морфогенеза позвоночных область гаструлы, из которой в дальнейшем формируется нервная система, представляет

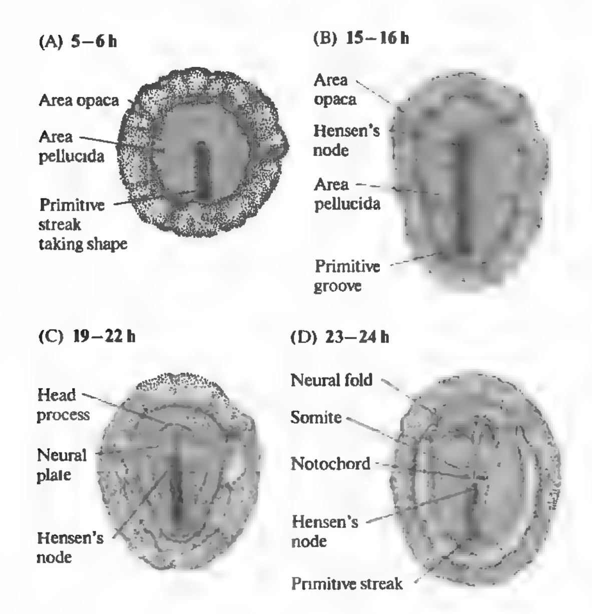


Рис. 23.1. Ранний морфогенез в эмбрионе позвоночного. Вид сзади на развивающийся эмбрион цыпленка в первый день жизни. (A) 5–6 ч.: образование и удлинение первичной полоски (B) 15–16 ч.: образование первичного желобка и Гензеновского узелка. (C) 19–22 ч.: образование головного отростка и нервной пластинки. (D) 23–24 ч.: образование нервного валика, хорды и мезодермальных сомитов.

Fig. 23.1. Early Morphogenesis in the vertebrate embryo. Dorsal views of the first day in the development of a chick embryo. (A) 5–6 h: formation and elongation of the primitive streak. (B) 15–16 h: formation of the primitive groove and Hensen's node. (C) 19–22 h: formation of the head process and neural plate. (D) 23–24 h: formation of the neural fold, notochord, and mesodermal somites. (After Gilbert, 2000.)

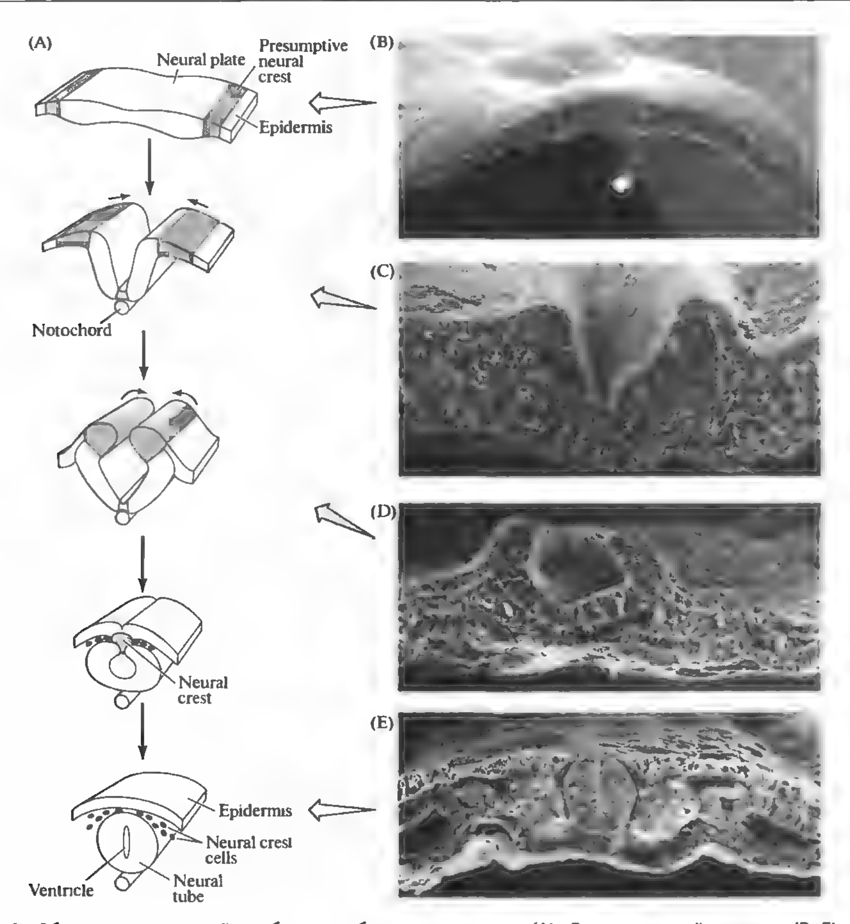


Рис. 23.2. Образование нервной трубки в эмбрионе цыпленка. (А) Диаграмма нейруляции. (B–E) Микрофотограммы образования нервной трубки, сделанные при помощи сканирующего электронного микроскопа. (B) Нервная пластинка, образованная продолговатыми клетками в дорзальной области эктодермы. (C) Нервный желобок, образованный продолговатыми нейроэпителиальными клетками и окруженный мезенхимальными клетками. (D) Нервные валики, покрытые уплощенными эпидермальными клетками. (E) Нервная трубка, покрытая эпидермисом с расположенными по обеим сторонам сомитами и хордой внизу.

Fig. 23.2. Formation of the Neural Tube in the chick embryo. (A) Diagram of neurulation. (B–E) Scanning electron micrographs of neural tube formation. (B) Neural plate, formed by elongated cells in the dorsal region of the ectoderm. (C) Neural groove, formed by elongated neuroepithelial cells and surrounded by mesenchymal cells. (D) Neural folds, covered by flattened epidermal cells. (E) Neural tube, covered by presumptive epidermis and flanked on the sides by somites and on the bottom by the notochord. (After Gilbert, 2000; photographs kindly provided by K. W. Tosney.)

собой простую полоску эктодермы (рис. 23.1). Клетки этой полоски находятся под влиянием факторов роста (включая два белка из семейства костных морфогенетических белков, BMP-2 и BMP-4), которые подавляют нервную дифференцировку и приводят к развитию эпидермальной ткани[7]. Затем из особого «организационного» региона гаструлы, названного **Шпемановским организационным центром** (Spemann organizer, в яйцах амфибий) или **Гензеновским узелком** (Hensen's node, у эмбрионов цыпленка и млекопитающих), происходит выделение свободно диффундирующих белков, которые блокируют действие этих факторов роста. Эти белки (известные как фоллистатин (follistatin), ноггин (noggin) и хордин (chordin)) активируют сигнальные каскады в клетках, расположенных рядом с организационным центром, что приводит к дифференцировке клеток в нейроны и формиро-

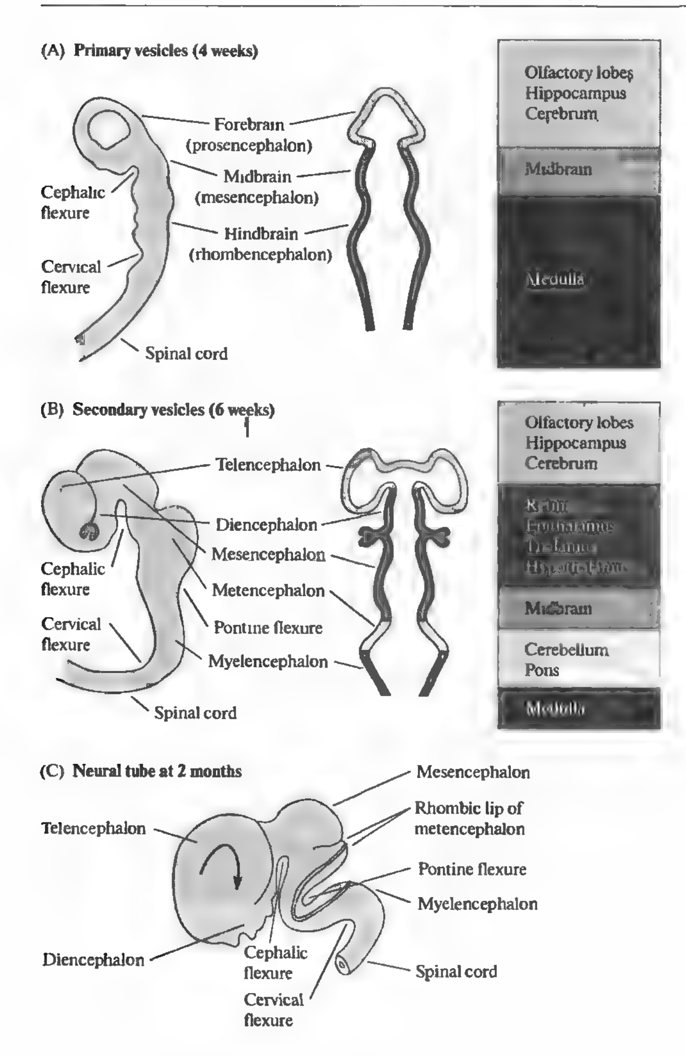


Рис. 23.3. Ранний период развития головного мозга человека. Вид сбоку на развивающийся мозг и схематический горизонтальный срез через пузыри. (А) На 4 неделе развития ЦНС человека состоит из трех первичных пузырей. (В) К 6 неделе развития можно различить пять вторичных пузырей. (С) В возрасте 2 месяцев серии складок, сужений и утолщений образуют различные области мозга. Дальнейшее развитие характеризуется преимущественным ростом конечного мозга в форме буквы «С» (показано стрелками).

Fig. 23.3. Early Human Brain Development. Lateral views of the developing brain and corresponding schematic horizontal sections through the vesicles. (A) At 4 weeks of development, the human CNS consists of three primary vesicles. (B) At 6 weeks of development, five secondary vesicles can be distinguished. (C) By 2 months, a series of flexures, constrictions, and swellings form the various regions of the brain. Further development is dominated by rapid growth of the telencephalon in a "C" shape (arrow). (After Nolte, 1988.)

ванию **нервной пластинки**. Нервная пластинка представляет собой полоски продолговатых нейроэктодермальных клеток, из которых в дальнейшем будет сформирована нервная система.

Нервная пластинка затем утолщается по своему краю, края ее приподнимаются, образуя **нервные валики**, которые сливаются друг с другом по средней линии, образуя полую **нервную трубку** (рис. 23.2). Процесс, благодаря которому осуществляется формирование нервной пластинки и превращение ее в нервную трубку, называется **нейруляцией**. Некоторые из клеток, расположенные по краям нервных валиков, остаются между нервной трубкой и вышележащей эктодермой. Эти клетки формируют **нервный гребень**. Клетки нервного гребня мигрируют в направлении от нервной трубки и образуют большое разнообразие периферических тканей, в том числе нейроны и клетки-спутники в сенсорной, симпатической и парасимпатической нервной системе, клетки надпочечника, пигментные клетки эпидермиса, кости и соединительные ткани в области головы.

По мере развития в передней (головной или ростральной) части нервной трубки формируется серия утолщений, сужений и изгибов, образующих отдельные анатомические области мозга (рис. 23.3). Каудальная часть нервной трубки остается относительно простой по строению, сохраняя вид полой труб-

ки, и в дальнейшем на ее основе формируется спинной мозг.

Образование предшественников нервных клеток и глии

Стенка нервной трубки первоначально состоит из одного слоя быстро делящихся клеток. Каждая клетка простирается от полостного, **вентрикулярного** края к наружной, **пиальной** поверхности. По мере того, как каждая клетка проходит свой клеточный цикл, ее ядро мигрирует вверх и вниз от вентрикулярной (желудочковой) к пиальной поверхности (рис. 23.4А). Синтез ДНК происходит в то время, когда ядро расположено у пиальной поверхности; во время деления клетки (**cytokinesis**) ядро лежит у вентрикулярной поверхности и на некоторое время клетка теряет связь с пиальной поверхностью. После деления одна или обе дочерние клетки могут потерять контакт с вентрикулярной поверхностью и мигрировать вверх. Этот момент является переломным: они превращаются либо в нейроны, либо в клетки глии. Если они мигрируют в направлении от вентрикулярной зоны, большинству этих клеток суждено стать нейронами в **постмитотической фазе** (то есть они уже никогда не смогут делиться). Предшественники глиальных клеток, с другой стороны, могут делиться даже после достижения своего окончательного месторасположения.

По мере того, как все больше и больше формируется постмитотических клеток, нервная трубка утолщается и приобретает трехслойное строение: наиболее глубоко расположена **вентрикулярная зона** (где продолжается деление клеток), затем средняя зона в виде мантии (**плащевая зона**), где находятся тела мигрирующих нейронов, а также поверхностный краевой (**маргинальный**) слой, состоящий из отростков более глубоко расположенных клеток (рис. 23.4В). Такая трехслойная структура сохраняется в спинном и продолговатом мозге (рис. 23.4С). В других областях, таких как кора больших полушарий и мозжечок, некоторые нейроны мигрируют в краевую зону и формируют **корковую пластинку**, которая затем созревает и формирует взрослую кору.

Миграция нейронов в ЦНС

Во многих областях развивающегося мозга, например в коре полушарий и мозжечке, миграция нейронов зависит от радиально расположенных глиальных клеток (глава 8). Эти клетки поддерживают контакты с вентрикулярной и пиальной поверхностями нервной трубки. По мере утолщения нервной трубки из-за продолжающегося деления клеток в области вентрикулярного слоя и накопления нейронов в промежуточной зоне мантии и кортикальной пластинки, радиальные клетки глии значительно удлиняются. При помощи детального изучения развития мозжечка и коры методами световой и электронной микроскопии Ракич с коллегами[8)] показали, что нейроны движутся по «этажерке» из радиально расположенных клеток глии для того, чтобы достичь своего правильного расположения в коре (см. рис. 8.10). Наблюдения за мутантными мышами[9)] и опыты на клетках, выращенных в культуре[10)] подтвердили данное наблюдении о миграции нейронов. Сейчас начинают описываться белки, упрааляющие подобной миграцией нейронов. Они представляют собой нейрональный гликопротеин, известный как астротактин (astrotactin)[11)] и изоформы семейства рецепторов интегрина к молекулам адгезии экстрацеллюлярного матрикса (о чем мы поговорим ниже)[12)].

Нейроны способны мигрировать также и в направлении тех областей нервной системы, где нет радиально расположенных глиальных клеток. Одна интересная популяция нейронов, экспрессируюших гормоны гонадотропина (gonadotropin-releasing hormone (GnRH)), мигрирует с периферии в ЦНС (см. также главу 16). GnRH клетки проходят расстояние около 2 мм, мигрируя из области обонятельной ямки, эктодермальное производное (**плакода**) которой также образует эпителий носа, в область гипоталамуса по пути предварительно спроецированного туда аксона[13)].

Белки адгезии внеклеточного матрикса и миграция клеток нервного гребня

В периферической нервной системе клетки нервного гребня не мигрируют по путям предварительно спроецированного аксона или вдоль структур глиальных клеток. Их миграция управляется механизмами привлечения и отталкивания при контакте с поверхностью клеток и компонентами внеклеточного матрикса. Два белка адгезии внеклеточного матрикса, ламинин (laminin) и фибронектин (fibronectin), концентрируются вдоль путей миграции клеток нервного гребня у эмбриона (рис. 23.5)[14)]. Агенты, которые угнетают

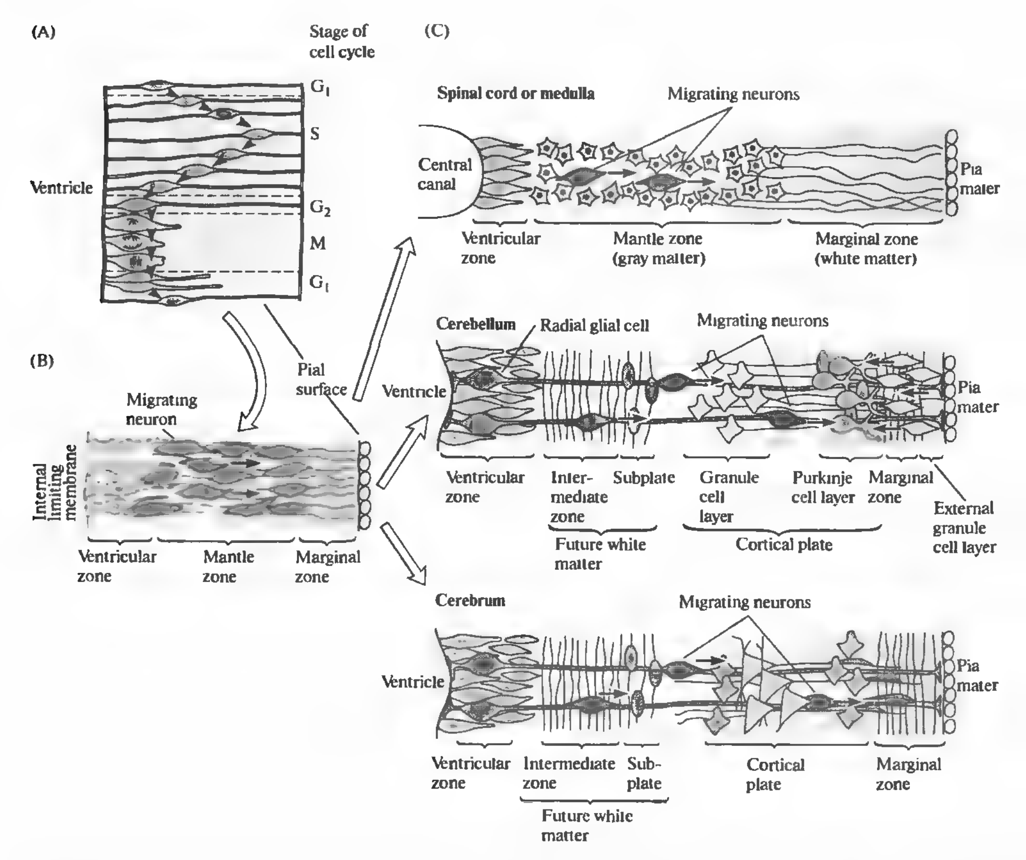


Рис. 23.4. Дифференцировка клеток стенок нервной трубки. (A) Расположение ядер в клетках в первичной нервной трубке в зависимости от стадии клеточного цикла. (B) Клетки, становясь постмитотическими, мигрируют прочь от вентрикулярной зоны и образуют плащевую зону. Их отростки направляются в краевую зону. (C) Трехслойная организация сохраняется в спинном мозге. В мозжечке и головном мозге нейроны мигрируют в краевую зону и образуют там многослойную кору.

Fig. 23.4. Differentiation of the Walls of the Neural Tube. (A) The position of the nuclei in cells in the primitive neural tube varies during the cell cycle. (B) Cells become postmitotic, migrate away from the ventricular zone, and form the mantle zone. Their processes make up the marginal zone. (C) The three-layered organization persists in the spinal cord. In the cerebellum and cerebrum, neurons migrate into the marginal zone to form a multilayered cortex. (After Gilbert, 1991.)

взаимодействие между рецепторами интегрина и компонентами внеклеточного матрикса, блокируют перемещение *in vitro* клеток нервного гребня вдоль поверхности, покрытой молекулами адгезии внеклеточного матрикса, а также миграцию *in vivo* клеток нервного гребня. Другой белок внеклеточного матрикса, Ф-спондин (F-spondin), экспрессируется в областях, граничащих с маршрутами миграции клеток нервного гребня. Он ингибирует перемещение клеток гребня, таким образом направляя их на правильный путь[15].

§ 2. Региональная спецификация нервной ткани

У взрослых животных клетки различных областей нервной системы имеют существенные отличия в своем фенотипе в зависимости от той функции, которую они выполняют. Клетки мозжечка отличаются от клеток коры полушарий, и оба типа клеток — от сетчатки. Каким образом происходит формирование таких различных фенотипов клеток в процес-

Рис. 23.5. Миграция клеток нервного гребня в область туловища у эмбриона цыпленка. Клетки гребня мигрируют вентрально через передний склеротом — регион, богатый ламинином и фибронектином, — и избегают задний склеротом, который богат Ф-спондином. Эти клетки становятся нейронами дорзальных рогов спинного мозга и автономных ганглиев, швановскими клетками, и хромаффинными клетками надпочечников. На более поздних этапах развития клетки нервного гребня мигрируют дорзолатерально под эпидермис и формируют образующие пигмент меланоциты.

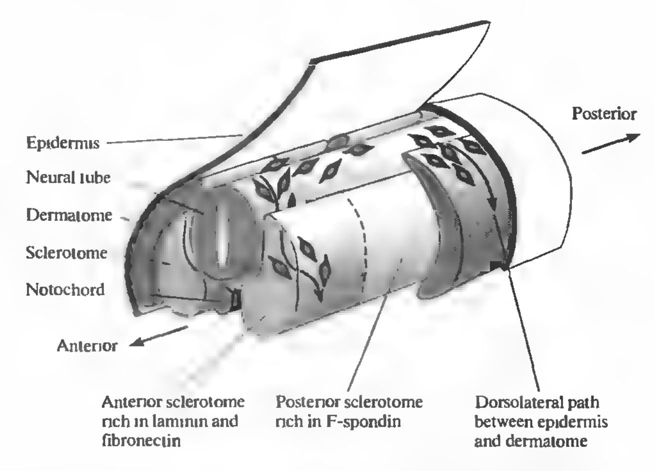


Fig. 23.5. Migration of Neural Crest Cells in the trunk region of the chick embryo. Crest cells migrate ventrally through the anterior sclerotome, a region rich in laminin and fibronectin, and avoid the posterior sclerotome, a region rich in F-spondin. These cells become neurons of the dorsal root and autonomic ganglia, Schwann cells, and adrenal chromaffin cells. Later in development, crest cells migrate dorsolaterally beneath the epidermis to form pigment-producing melanocytes.

Рис. 23.6. Развитие заднего мозга позвоночных в виде сильно сегментированной структуры. (А) Диаграмма трехдневного эмбриона цыпленка, иллюстрирующая сегментарную организацию ромбомеров (r1–r8) в заднем мозге. (В) Паттерн организации клеток в ромбомерах r1–r7 трехдневного мозга цыпленка. Ретикулярные нейроны (слева) и брахиомоторные нейроны (справа) образуют сегментарный повторяющийся паттерн. Мотонейроны и их аксоны образуют черепно-мозговые нервы V, VII и IX пары.

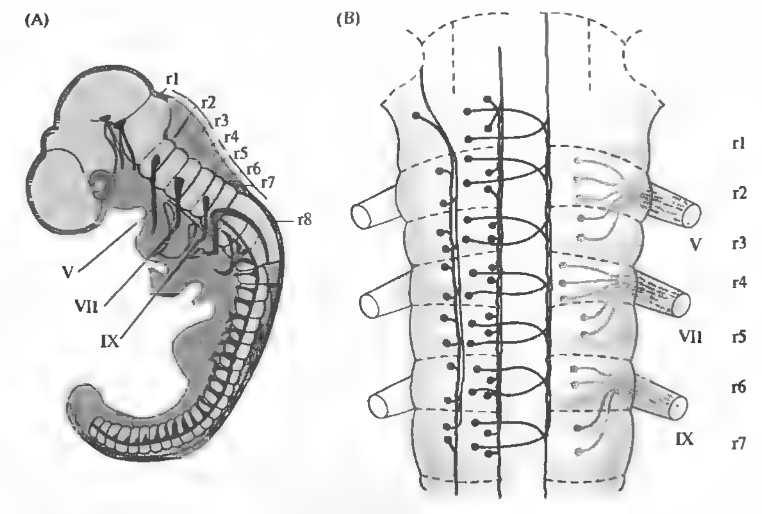


Fig. 23.6. The Vertebrate Hindbrain Develops as a Conspicuously Segmented Structure. (A) Diagram of a 3-day chick embryo, illustrating the segmental arrangement of rhombomeres (r1–r8) in the hindbrain. (B) Pattern of cell organization in rhombomeres r1 to r7 of the 3-day chick embryonic hindbrain. Reticular neurons (left side) and branchiomotor neurons (right) occur in a segmentally repeating pattern. Motor neurons send their axons into cranial nerves V, VII, and IX. (After Keynes and Lumsden, 1990, and Lumsden and Krumlauf, 1996.)

се развития? Как и у других клеток, фенотип нейрона определяется тем, какие гены он экспрессирует, что, в свою очередь, контролируется факторами транскрипции, белками, которые связываются с регуляторными зонами одного или нескольких генов и влияют на процессы их транскрипции. Развитие характеризуется последовательной и иерархической экспрессией факторов транскрипции, каждый из которых влияет на экспрессию последующего и ограничивает конечный фенотип клетки.

Исследованию региональной спецификации нервной ткани в мозгу позвоночных зна-

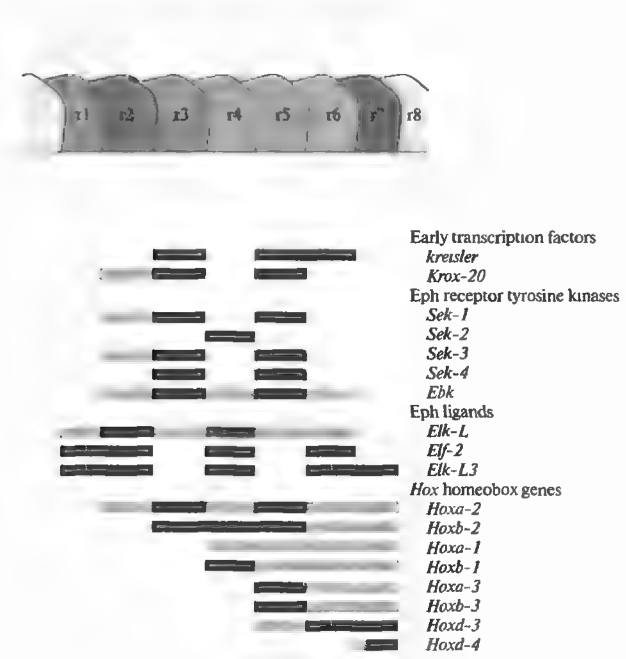


Рис. 23.7. Сегментарная экспрессия генов в ромбомерах с r1 до r8 в заднем мозге позвоночных. Серые полоски указывают ромбомеры, в которых происходит экспрессия генов; черные полоски указывают высокий уровень экспрессии. Ранние факторы транскрипции, рецептор тирозинкиназы семейства Eph и его лиганды образуют сегментарный паттерн ромбомеров. Семейство гомеобоксных генов *Hox* определяет судьбу клеток в пределах каждого ромбомера в зависимости от сегмента. Данные получены на эмбрионах цыплят и мышей.

Fig. 23.7. Segmental Expression of Genes in Rhombomeres r1 to r8 of the vertebrate hindbrain. Grey bars indicate rhombomeres in which each gene is expressed; black bars indicate a high level of expression. Early transcription factors, Eph family receptor tyrosine kinases, and Eph ligands establish the segmental pattern of rhombomeres. The *Hox* homeobox genes determine the fate of cells within each rhombomere in a segmentally specific way. Data from chick and mouse. (After Lumsden and Krumlauf, 1996.)

чительно помогло то, что были открыты гомологи генов плодовой мухи дрозофилы, которые определяют расположение и зависящую от расположения дифференцировку клеток эмбриона. Эти гены оказались сходными с генами позвоночных и часто выполняют сходные функции. Большинство из этих генов кодирует факторы транскрипции.

Гомеотические гены и сегментация

Удивительными примером подобного сходства в функционировании генов у настолько разных животных являются результаты исследований заднего мозга позвоночных. В отличие от всего остального мозга позвоночных, задний мозг эмбриона (**rhombencephalon**) имеет четкое сегментарное строение. Каждый сегмент его демонстрирует общий паттерн нервной дифференцировки, однако от сегмента к сегменту дифференцировка имеет свои особенности (рис. 23.6). Было идентифицировано несколько генов, паттерны экспрессии которых на ранних стадиях развития коррелируют с границами сегментов заднего мозга (рис. 23.7)[16]. Эти гены делятся на две категории:

(1) Гены первой категории играют роль в создании общей структуры, состоящей из повторяющихся сегментных единиц. Некоторые гены этой группы кодируют факторы транскрипции (*kreisler*, *Krox*-20), другие кодируют рецептор тирозинкиназы (*Sek*-1 по *Sek*-4) или его лиганды (*Elf*-2). (Рецептор тирозинкиназы представляет собой трансмембранный белок, у которого внутриклеточный домен, представляющий собой фермент тирозинкиназу, активируется при связывании лиганда с внеклеточным доменом.)

(2) Вторая категория содержит гены, которые определяют судьбу каждого сегмента. Эти гены образуют высококонсервативное семейство *Hox* генов.

Свойства *Hox* генов были впервые описаны у дрозофилы, у которой они регулируют гомеостаз[17]. Гомеотические гены представляют собой управляющие гены, которые координируют экспрессию многих других генов во время развития. Например, мутация гомеотических генов семейства *Hox* у дрозофилы приводит к тому, что одна часть тела заменяется другой; таким образом на месте антенны может развиться нога. Гомеотические гены содержат консервативную последовательность ДНК, **гомеобокс**. Гомеобокс кодирует последовательность из 60 аминокислот, которые

распознают и связываются с определенной последовательностью ДНК серии подчиненных генов. Каждый гомеотический ген, таким образом, координирует экспрессию большого числа генов, которые вместе определяют строение одного сегмента эмбриона.

Сегментарный паттерн экспрессии генов семейства *Hox* наблюдается в заднем мозгу цыплят и грызунов, что приводит нас к предположению, что *Hox* гены могут играть роль гомеотических управляющих генов, регулирующих процессы развития позвоночных и создания определенных структур относительно рострокаудальной оси в определенных областях заднего мозга эмбриона. Данные, полученные при помощи трансплантации, выключения определенных генов и эктопической экспрессии, согласуются с этими идеями[18, 19]. Дополнительным доказательством является изучение мутаций *Hox* генов и других гомеобоксных генов у человека, которые приводят к изменениям в определенных областях ЦНС[20, 21].

Следующий очевидный вопрос: а что определяет паттерн экспрессии *Hox* генов? Ответом, по крайне мере частично, является градиент **ретиноевой кислоты**[22]. Ретиноевая кислота вырабатывается в Гензеновском узелке, который называется Шпемановским организатором (Spemann organizer) у эмбрионов птиц и позвоночных (см. рис. 23.1). Но ретиноевая кислота не просто активирует транскрипцию всех *Hox* генов: была описана систематическая разница чувствительности различных генов *Hox* семейства к ретиноевой кислоте. Таким образом, диффузия ретиноевой кислоты из Гензеновского узелка способствует формированию градиента, который играет большую роль в упорядоченной экспрессии различных *Hox* генов в рострокаудальном направлении в заднем мозге.

Хорда и базальная пластинка

Строение и функционирование нервной системы позвоночных варьируют в дорзовентральном и рострокаудальном направлении. Например, полоска специализированных глиальных клеток, названных **базальной пластинкой** (floor plate), расположена по средней линии вдоль вентральной поверхности спинного мозга. Соседние, более латерально расположенные **базальные** области нервной трубки образуют мотонейроны, более дорзальные зоны дают начало интернейронам, и самые дорзальные области образуют нервный гребень. Характерные свойства вентральной хорды, такие как дифференцировка базальной пластинки и образование мотонейронов, регулируются сигналом из спинного мозга (notochord)[23]. Таким образом, если пересадить в эмбрион еще одну хорду, рядом с нервной трубкой, то это приведет к формированию второй базальной пластинки и второй группы мотонейронов (рис. 23.8), а если у эмбриона удалить хорду, то ни мотонейроны, ни базальная пластинка не формируются.

Сигналы из хорды, которые управляют формированием клеток базальной пластинки и мотонейронов, являются продуктами транскрипции гена Sonic hedgehog[24]. Белок Sonic hedgehog синтезируется клетками хорды (а затем также клетками базальной пластинки), концентрируется на их поверхностях и диффундирует к соседним клеткам. Высокий уровень Sonic hedgehog на поверхности хорды приводит к формированию клеток базальной пластинки из клеток нервной трубки. Более низкий уровень ведет к экспрессии гомеотического гена (*Nkx*-2.2), что вызывает развитие клеток в висцеральные мотонейроны[25]. Еще более низкий уровень Sonic hedgehog вызывает транскрипцию *Pax*-6, которые угнетают экспрессию *Nkx*-2.2, что позволяет клеткам развиваться по их основному пути и становиться соматическими мотонейронами.

Общая схема региональной дифференцировки

Рострокаудальный и дорзовентральный градиенты факторов транскрипции определяют локальную идентификацию клеток в пределах ЦНС[26, 27]. Эти же факторы способны приводить к развитию довольно различных свойств в зависимости от того, в каком месте эмбриона они экспрессируются. Например, белок Sonic hedgehog определяет вентральный фенотип вдоль рострокаудальной оси, приводя к образованию мотонейронов в спинном мозге, серотонинергических нейронов в передней части заднего мозга, дофаминергических нейронов в задней части заднего мозга, глазодвигательных нейронов в передней области среднего мозга[28, 29]. Подобным же образом другие факторы транскрипции (BMP-4 и BMP-7) приводят к образованию дорзального фенотипа[30]. Общим правилом является то, что возможные пути развития плюрипотентной клетки-предшественницы в определенной области развивающейся

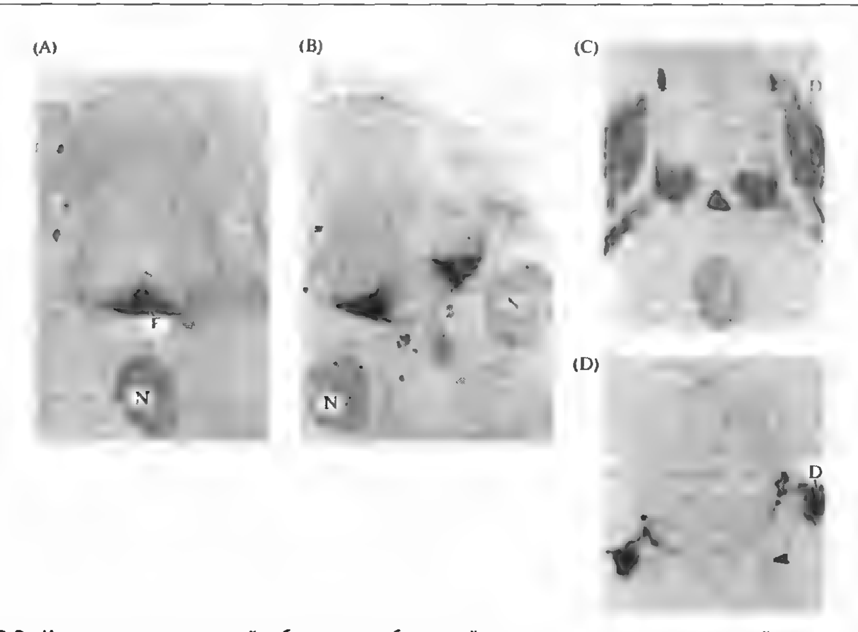


Рис. 23.8. Индуцированное хордой образование базальной пластинки и двигательных нейронов во время развития спинного мозга. (А и В) Специфическая окраска при помощи антител к клеткам базальной пластинки (F). (А) Нормальный эмбрион цыпленка. (В) Добавление клеток второй хорды (N) вызывает образование второй базальной пластинки. (С и D) Специфическая окраска при помощи антител к клеткам базальной пластинки, двигательным нейронам и афферентам спинального ганглия. (С) Нормальный эмбрион. (D) При удалении хорды клетки базальной пластинки и двигательной пластинки отсутствуют, а клетки спинального ганглия (D) занимают необычное вентральное положение. Аксоны сенсорных интернейронов, которые обычно идут в составе вентральной части спинного мозга, сейчас формируют пучки волокон, которые покидают спинной мозг (стрелка).

Fig. 23.8. The Notochord Induces Formation of the Floor Plate and Motor Neurons during development of the spinal cord. (A and B) Specific labeling with an antibody that recognizes floor plate cells (F). (A) Normal chick embryo. (B) Addition of a second notochord (N) induces a second floor plate. (C and D) Specific labeling with an antibody that recognizes floor plate cells, motor neurons, and dorsal root ganglion afferents. (C) Normal embryo. (D) If the notochord is removed, floor plate cells and motor neurons are absent, and the dorsal root ganglia (D) occupy an unusually ventral position. Axons of sensory interneurons, which normally run within the ventral cord, now form a fiber bundle the exits the cord (arrowhead). (After Placzek et al., 1991.)

нервной системы в первую очередь ограничиваются ее положением относительно переднезадней оси, например, путем экспрессии *Hox* генов (рис. 23.9)[31]. Возможные клеточные фенотипы в дальнейшем еще более ограничиваются с учетом дорзовентрального положения по средней линии при помощи таких посредников, как Sonic hedgedog.

§ 3. Происхождение нейронов и клеток глии

У позвоночных индукционные взаимодействия между клетками играют важную роль в определении их дальнейшей судьбы. У более простых организмов судьба клетки может быть определена автономно на основании ее происхождения.

Происхождение клеток и индукционные взаимодействия в простых нервных системах

Происхождение клеток наиболее хорошо исследовано на примере простых беспозвоночных, таких как пиявка, кузнечик, плодовая муха и маленькая нематода *Caenorhabditis elegans*[32)–34)]. В этих препаратах возможно проследить развитие каждой клетки и исследовать формирование таких характеристик, как свойства мембраны, трансмиттеры, рост аксонов и их ветвление. У *C. elegans*, которая содержит всего около 300 нейронов, эмбрион настолько маленький и прозрачный, что мож-

Рис. 23.9. Система координат пространственной информации в заднем мозге позвоночных, устанавливаемая в два этапа. (A) Сначала определяется рострокаудальная позиция, например по экспрессии гена *Hox*. (B) После этого дорзовентральная позиция определяется градиентами сигналов средней линии, такими как Sonic Hedgehog и BMP-4/7. (C) Результирующая двумерная система координат пространственной информации ограничивает возможный репертуар клеточной дифференцировки плюрипотентных клеток-предшественников.

Fig. 23.9. A Coordinate System of Positional Information in the Vertebrate Hindbrain is established in two steps. (A) First, anteroposterior position is encoded—for example, by *Hox* gene expression. (B) Subsequently, dorsoventral position is encoded by gradients of midline signals such as Sonic hedgehog and BMP-4/7. (C) The resulting two-dimensional coordinate system of positional information restricts the repertoire of cell fates available to pluripotent precursor cells. (After Simon, Hornbruch, and Lumsden, 1995.)

но идентифицировать каждый нейрон и проследить его работу при помощи микроскопа. Альтернативным подходом может быть маркирование отдельных клеток и определение того, какие типы клеток из них получаются. Такого рода анализ, впервые предложенный Вайсблатом, Стентом и их коллегами для эмбрионов пиявки, включает в себя введение внутриклеточных маркеров, таких как флуоресцентный декстран или фермент пероксидаза хрена (HPR), в отдельные клетки и таким образом исследование дальнейшего потомства либо на живом эмбрионе, либо после окраски эмбриона, когда можно увидеть клетки, в которых находится фермент[35]. Можно провести сравнительные эксперименты, вводя комплементарные цепи ДНК, кодирующие гены флуоресцентного белка, или создавая трансгенных животных, которые экспрессируют этот протеин[36].

Эксперименты подобного рода показывают, что у простых беспозвоночных вполне возможно воспроизвести определенную последовательность в делении и дифференцировке клеток. Таким образом, используя луч лазера можно вызывать гибель отдельных идентифицированных клеток с целью проследить, каким образом это повлияет на судьбу оставшихся клеток. В большинстве случаев выжившие клетки игнорируют потерю своего соседа, направление их развития определено автономно, на основании того, к какой клеточной линии они принадлежат. У подобных клеток экспрессия генов определяется факторами, которые изначально находятся в их цитоплазме или ядре и представляют собой независимые внутриклеточные сигналы[37]. В других случаях, однако, потеря соседа может повлиять на судьбу выживших клеток[38]. Таким образом, даже у животных, у которых имеются жестко определенные паттерны деления клеток, их дальнейшее развитие может изменяться в зависимости от индукционных взаимодействий.

Индукционные взаимодействия при развитии глаз дрозофилы

Стереотипно происходящее развитие сложного глаза дрозофилы представляет собой еще одну систему, в которой возможно прямое наблюдение для идентификации отдельных клеток и прослеживания их дальнейшего развития[39]. Кроме того, генетика дрозофилы дает очень большие возможности для оценки роли происхождения клеток и индукционных взаимодействий между ними в дифференцировке нервной ткани. Возможно выделение мутантов, у которых нет определенного клеточного типа или у которых паттерн дифференцировки лишь незначительно нарушен, что позволяет определить их влияние на судьбу остальных клеток.

Подобная техника была использована в экспериментах Бензера, Реди, Рубина, Томлисона, Цирупски и их коллег, которые исследовали дифференцировку нейронов и сопутствующих (опорных) клеток глаза. Глаз дрозофилы состоит из кристаллоподобного

(A)



Рис. 23.10. Индукционные взаимодействия, регулирующие развитие фоторецепторных клеток у дрозофилы. (A) Сканограмма сложного глаза дрозофилы. Каждая фасетка представляет собой один омматидий. (B) Нормальное развитие дифференцировки восьми фоторецепторов в каждом омматидии. *Sevenless* (*sev*⁻) и *bride of seven* (*boss*⁻) мутации нарушают дифференцировку R7. (C) Сигнальные каскады, регулирующие дифференцировку R7. Продукт *boss* гена, интегральный мембранный белок, экспрессируемый в R8 (Boss), активирует продукт гена *sev*, рецептора тирозинкиназы (SevRTK). Sev киназа запускает внутриклеточный сигнальный каскад, активирующий MAP киназу, которая имеет несколько мишеней. MAP киназа фосфорилирует протеин Yan (который бы иначе блокировал дифференцировку), приводя к его распаду. MAP киназа также вызывает экспрессию белка Phyl, который вместе со вторым протеином, Sina, приводит к распаду фактора транскрипции Ttk88. Ttk88 предотвращает нервную дифференцировку. MAP киназа также активирует Pntp2 и AP-1, два фактора транскрипции, которые способствуют нейрональной дифференцировке.

(B)

(C)

Fig. 23.10. Inductive Interactions Regulate Development of photoreceptor cells in *Drosophila*. (A) Scanning electron micrograph of a compound eye in *Drosophila*. Each facet is an ommatidium. (B) Normal progression of differentiation of the eight photoreceptors in each ommatidium. *Sevenless* (*sev*⁻) and *bride of sevenless* (*boss*⁻) mutations each prevent differentiation of R7. (C) Signaling pathway regulating the differentiation of R7. The product of the boss gene, an integral membrane protein expressed in R8 (Boss), activates the product of the sev gene, a receptor tyrosine kinase (SevRTK). The Sev kinase triggers an intracellular signaling cascade that activates MAP kinase, which has several targets. MAP kinase phosphorylates the protein Yan, causing it to be degraded. Yan would otherwise block differentiation. MAP kinase also causes expression of the protein Phyl, which together with a second protein, Sina, causes the transcription factor Ttk88 to be degraded by the ubiquitin–proteasome pathway. Ttk88 prevents neuronal differentiation. MAP kinase also activates Pntp2 and AP-1, two transcription factors that promote neuronal differentiation. (After Dickson, 1998; micrograph kindly provided by D. F. Ready.)

набора повторяющихся единиц, называемых омматидиями (рис. 23.10А), каждый из которых содержит 8 фоторецепторов (R1-R8). Первая клетка, которая определяет начало дифференцировки в каждом омматидии, является одним из фоторецепторов, R8. Клетки R8 появляются хаотично в области нейроэпителия. Как только началась дифференцировка клетки R8, это приводит к ингибированию дифференцировки ее соседей в клетки R8. Затем дифференцировке подвергаются клетки R2 и R5, после чего R4, R1 и R6 и, наконец, R7 (рис. 23.10В). Были обнаружены две мутантные линии, в которых глаза развиваются нормально, за исключением того, что не образуется R7 (рис. 23.10В). Такие линии были названы *sevenless* (*sev*$^-$) и *bride-of-sevenless* (*boss*$^-$) для обозначение отсутствия образования R7. При детальном исследовании этих мутантных линий впервые были изучены молекулярные механизмы того, как индукционные взаимодействия между клетками могут влиять на дальнейшее развитие клеток[40)–42)].

Ген *sevenless* кодирует рецептор (называемый Sevenless, или Sev), для которого продукт экспрессии *bride-of-sevenless* гена, названный Boss, является лигандом. Во время развития R8 индуцирует образование R7. Это происходит, когда Boss, экспрессируемый на поверхности клетки R8, связывается с Sev, который расположен на клетке-предшественнице R7 (рис. 23.10С). Взаимодействие между Boss и Sev активирует внутриклеточный домен Sev рецептора, тирозинкиназу, которая инициирует сигнальный каскад в клетке R7, приводящий к ее дифференцировке. Сигнальный каскад является сложным путем, который включает в себя последовательную активацию серии протеинкиназ (ферментов, которые фосфорилируют белки), что приводит к ингибированию негативного влияния, а также увеличению позитивного влияния на экспрессию генов R7. Большое количество сигналов, которые приводят к изменениям в экспрессии генов, осуществляют это через тирозинкиназы, которые управляют данными клеточными каскадами.

Происхождение клеток в ЦНС млекопитающих

Изучать последовательность развития клеток в ЦНС млекопитающих технически более сложно, потому что отдельные клетки труднее идентифицировать и заполнить красителем. Удачными методиками исследования здесь показали себя картирование путей развития генетически помеченных клеток у химерных животных — эмбрионов и взрослых[43)], а также инфицирование клеток ЦНС развивающихся животных специально созданными вирусами (рис. 23.11)[44)–46)]. Подобные вирусы сконструированы таким образом, что они перманентно включаются в состав хромосом клетки-хозяина, реплицируются во время деления клетки, и, следовательно, передаются потомкам этой клетки. Таким образом, информация, находящаяся в вирусе, не уменьшается при делении клеток. Присутствие вируса может быть затем обнаружено на любой стадии развития клеток, используя белок, который он кодирует. При условии, что изначально количество инфицированных клеток мало, в дальнейшем можно будет сделать вывод, что кластер клеток, содержащих данный белок, является клоном, потомством той самой клетки, которая была ранее инфицирована.

Например, когда такой вирус был введен в глаз новорожденного крысенка, а сетчатка была исследована во взрослом возрасте, белок содержали как глиальные клетки, так и несколько типов нейронов[44)]. Таким образом, общая клетка-предшественница в сетчатке при делении образует как нейрональные, так и глиальные клетки.

В отличии от пиявки или дрозофилы, в сетчатке грызунов нет специфической последовательности развития клеток, когда одна клетка образует несколько различных типов нейронов. В данном случае, вероятно, клетка-предшественник имеет некоторую внутреннюю информацию (intrinsic competence) о том, как отвечать на внешние сигналы и сигналы, которые находятся в окружающей ее среде. Эти сигналы меняются со временем, что приводит к последовательному формированию клеток разных типов[47)]. С другой стороны, когда подобные эксперименты проводились в коре больших полушарий, клоны, которые содержали бы и глиальные клетки, и нейроны, были довольно редки. Это дает основания полагать, что в момент инфицирования отдельные популяции клеток-предшествеников глиальных и нервных клеток уже сформировались в вентрикулярной области коры[45)]. Более того, клоны большей частью содержали исключительно пирамидные или непирамидные клетки, показывая, что разделение между этими двумя линиями происходит на раннем этапе нейрогенеза[48)].

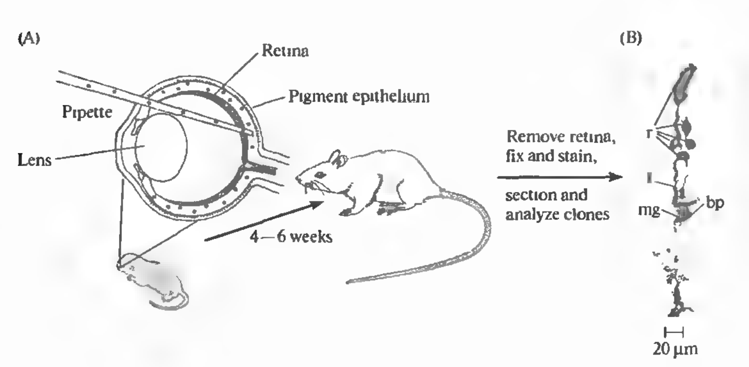


Рис. 23.11. Клетки одного клона помечены при помощи введения ретровирусных маркеров в сетчатку крысы. (А) Ретровирус, кодирующий бета-галактозидазу был введен в глаз между сетчаткой и пигментным эпителием в раннем периоде развития, что привело к заражению нескольких предшественников клеток сетчатки. (В) Окрашивание сетчатки взрослого при помощи гистохимической реакции на бета-галактозидазу выявляет кластеры, содержащие метку и являющиеся потомками одной клетки-предшественницы. Изображение клона включает в себя 5 палочек (r), одну биполярную клетку (bp) находящуюся вблизи к терминали палочки (t), мюллеровскую глиальную клетку (mg).

Fig. 23.11. Clonally Related Cells Are Labeled by Injecting Retroviral Markers into the rat retina. (A) A retrovirus encoding β-galactosidase is injected into the eye between the retina and the pigment epithelium early in development, infecting a few retinal precursor cells. (B) Staining the adult retina with a histochemical reaction for β-galactosidase reveals a cluster of labeled progeny of a single precursor cell. Camera lucida drawing of a clone that includes five rods (r), one bipolar cell (bp) juxtaposed to the terminal of a rod cell (t), and a Müller glial cell (mg). (After Turner and Cepko, 1987.)

Резюмируя вышесказанное, в нервной системе простых организмов возможный спектр дальнейшего развития клетки (lineage history) ограничивает потенциал ее развития. В ЦНС более сложных животных существуют индукционные взаимодействия между клетками, которые играют исключительную роль в направлении развития клетки. В хорошо известной и искрометной аналогии Сидней Бреннер охарактеризовал два пути развития клетки как «план по-американски» и «план по-европейски»: «по-европейски» то, кто ты есть (какой нейрон), определяется твоими предками; «по-американски» это определяется твоими соседями.

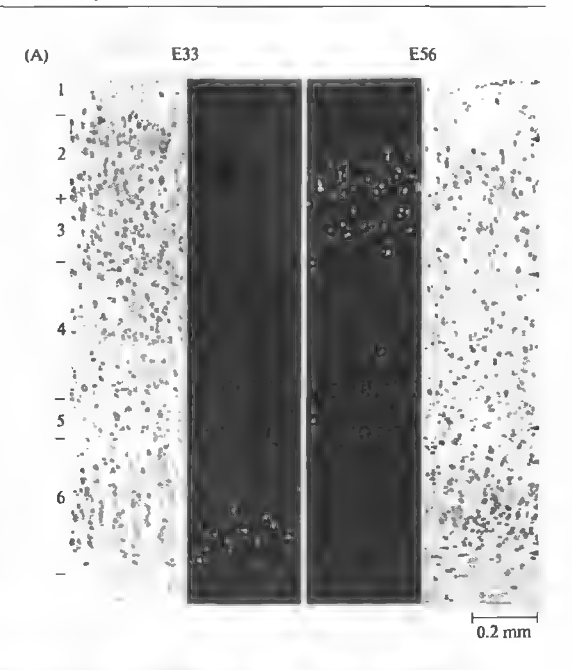
Взаимосвязь между временем образования нейронов и судьбой клеток

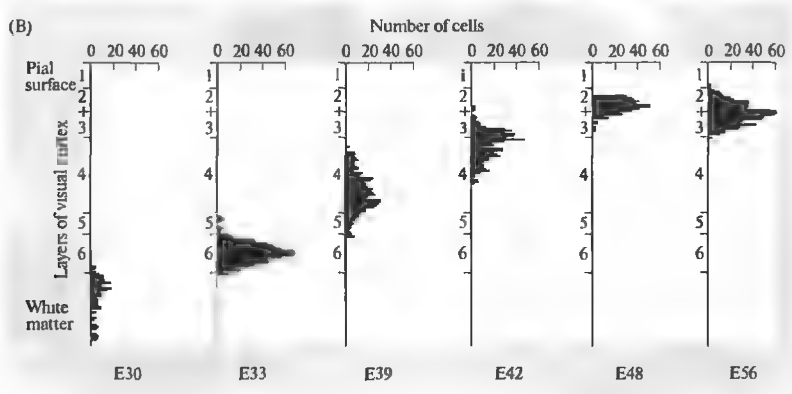
Существен ли для развития нейрона момент времени, когда его клетка-предшественница прекращает делиться и мигрирует прочь от вентрикулярной зоны? На данный вопрос можно ответить при помощи маркировки нейронов в то время, когда они переходят в постмитотическое состояние, или «рождаются». В этой технике, впервые разработанной Ангевином и Сидманом[49], производится однократное введение [^{3}H]-тимидина либо внутриматочно, либо внутривенно в определенный день развития. Эта метка захватывается и встраивается в ДНК клетки, находящейся в стадии деления в данный момент. Невстроившийся тимидин быстро исчезает из кровотока. Таким образом, клетки, находящиеся в постмитотической стадии, не содержат метки. В клетке, которая продолжает делиться после введения метки (глиальные клетки и клетки-предшественницы, которые остаются в вентрикулярной зоне), метка может уменьшаться в концентрации во время удвоения ДНК и следующего за ним деления клетки. Однако, если клетка делится во время пика концентрации [^{3}H]-тимидина и одна или обе дочерние клетки прекращают деление, мигрируя прочь от вентрикулярной зоны и дифференцируясь в нейроны, тогда эти нейроны имеют очень высокую концентрацию [^{3}H]-тимидина. Таким образом, путь развития нейрона, образовавшегося в определенный день развития, может быть визуализован путем однократного введения эмбриону [^{3}H]-тимидина в данный день, после чего продолжается нормальное развитие эмбриона, и в дальнейшем ауторадиография используется для обнаружения помеченных клеток.

Использование этой техники позволило выявить, что в головном мозге (ГМ) млекопитающих имеется систематическая взаимосвязь между временем образования нейрона и местом его окончательного расположения в коре ГМ; развитие происходит по принципу «наоборот» (inside-out fashion) (рис. 23.12)[50, 51].

Рис. 23.12. Нейрогенез первичной зрительной коры кошки. (A) Ауторадиограмма срезов коры взрослого животного с [^{3}H]-тимидином, введенным эмбриону на 33-й (E33) и 56 (E56) день. Микрофотография этих же срезов в светлом поле, окрашенных крезил-виолетом, показывает, что наиболее окрашенные клетки расположены в слое 6 коры после введения в возрасте E33 и в слоях 2 и 3 после введения в возрасте E56. (B) Гистограмма, показывающая распределение клеток, помеченных в разные сроки между E30 и E56, иллюстрирует inside-out паттерн развития зрительной коры.

Fig. 23.12. Neurogenesis of the Primary Visual Cortex of the cat. (A) Autoradiographs of sections of the adult visual cortex of animals injected with [^{3}H]-thymidine on embryonic day 33 (E33) or 56 (E56). Bright-field micrographs of the same sections stained with cresyl violet indicate that heavily labeled cells are located in layer 6 after the E33 injection, and layers 2 and 3 after injection on E56. (B) Histograms showing the distribution of cells labeled on various days between E30 and E56 illustrate the inside-out pattern of neurogenesis in the visual cortex. (After Luskin and Shatz, 1985; micrograph kindly provided by M. B. Luskin.)





Нейроны самых глубоких кортикальных слоев образуются в первую очередь. Нейроны самых поверхностных слоев образуются позднее и мигрируют через клетки более глубоких слоев к месту своего окончательного расположения в коре. Схожее соответствие между временем образования и окончательным расположением нейрона наблюдается и в других отделах нервной системы, хотя и не во всех.

Каким образом мигрируют нейроны? Происходит ли этот процесс спонтанно в направлении изнутри наружу, пока они не достигнут поверхности развивающейся коры, или мигрирующий нейрон способен распознавать определенный слой, куда он должен мигрировать? Эксперименты на развивающихся хорьках показали, что кортикальные нейроны способны мигрировать в строго определенную позицию (рис. 23.13)[48, 52]. Клетки, в том числе эмбриональные предшественники нейронов слоя 5 и 6, извлекались из вентрикулярной зоны эмбрионов на ранних стадиях и трансплантировались в вентрикулярную зону эмбрионов на более поздних сроках, в область клеток, являющихся предшественниками более поверхностных слоев 2 и 3. Клетки-предшественники, которые были трансплантиро-

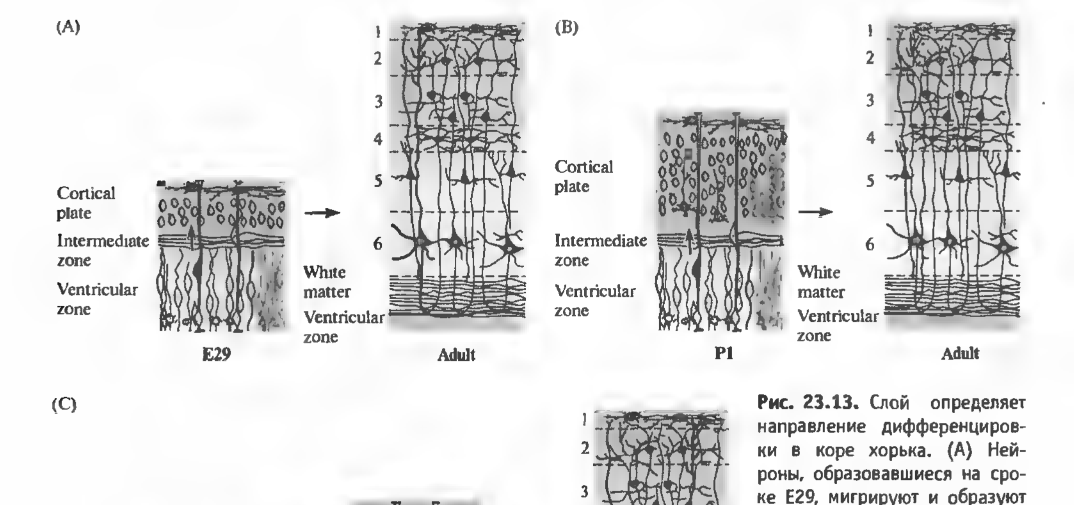


Рис. 23.13. Слой определяет направление дифференцировки в коре хорька. (А) Нейроны, образовавшиеся на сроке Е29, мигрируют и образуют слой 6 кортикальной пластинки у взрослых. (В) Нейроны, образовавшиеся в первый день постнатального развития (Р1), мигрируют и образуют слой 2/3 кортикальной пластинки взрослых. (С) Клетки, пересаженные из вентрикулярной зоны Е29 эмбриона в вентрикулярную зону Р1 новорожденных, следуют одним из двух возможных путей развития. Клетки, пересаженные на поздних стадиях своего последнего клеточного цикла или уже как постмитотические нейроны, еще не мигрировавшие из вентрикулярной зоны (показано черным), сохраняют свою исходную дифференцировку и мигрируют в слой 6. Клетки, пересаженные во время фазы S клеточного цикла (показано серым), меняют свою дифференцировку и мигрируют в слой 2/3.

Fig. 23.13. Laminar Fate Determination in the Cerebral Cortex of the ferret. (A) Neurons born on day E29 migrate to form layer 6 of the cortical plate in the adult. (B) Neurons born on postnatal day 1 (P1) migrate to form layer 2/3 of the adult cortical plate. (C) Cells transplanted from the ventricular zone of E29 embryos to the ventricular zone of P1 neonates adopted one of two fates. Cells transplanted while in the late stages of their final cell cycle or postmitotic neurons that had not yet migrated from the ventricular zone (black) maintained their original identity and migrated to layer 6. Cells transplanted while in the S phase of the cell cycle (grey) were respecified and migrated to layer 2/3.

ваны в ранней S фазе клеточного цикла (когда происходит синтез ДНК), изменяли свое развитие: нейроны, образовавшиеся из них, мигрировали в слои 2 и 3. Однако, если клетки были трансплантированы на более поздних стадиях их последнего клеточного цикла или уже являлись постмитотическими нейронами, мигрировавшими из вентрикулярной зоны, они сохраняли свою исходную дифференцировку. Они мигрировали только в пределах слоя 6, где останавливались и образовывали связи, характерные для своего типа дифференцировки. Таким образом, область, куда будет мигрировать кортикальный нейрон определяется, пока он находится в вентрикулярной зоне, непосредственно перед финальными митозом клетки.

Генетические аномалии строения коры у мышей линии *reeler*

Другой пример того, как определяется дальнейшее развитие нейрона до того, как он достигнет своего окончательного расположения, обнаружен у мутантных мышей линии *reeler*[*] (названных так из-за своей неровной походки). В развивающейся коре мышей *reeler* более молодые нейроны не ми-

[*] Reeler от английского to reel — идти, пошатываясь и спотыкаясь. — *Прим. перев.*

грируют сквозь слои других клеток[53]. Таким образом, их расположение друг относительно друга у взрослых противоположное: нейроны, образованные раньше, располагаются в более поверхностных слоях, а нейроны, рожденные позже, — в более глубоких. Несмотря на аномальное расположение, нейроны имеют правильную исходную морфологию (определяемую моментом рождения) и образуют между собой связи в зависимости от времени образования. Получается, что морфология корковых нейронов и природа их синаптических взаимодействий определяются в момент рождения нейрона и могут проявляться независимо от его расположения. Такой *reeler* фенотип является результатом большого количества мелких изменений в результате мутации в коре и других областях мозга.

Продуктом экспрессии гена *reeler* является большой гликопротеин внеклеточного матрикса, называемый reelin[54]. Он не экспрессируется в кортикальных клетках, не мигрирующих правильным образом, а в основном экспрессируется в клетках Кахаля—Ретциуса в краевой зоне коры[55]. Нарушения экспрессии других генов в кортикальных клетках могут приводить к сходным с *reeler* фенотипам проявления. Например, мутация цитоплазматического белка, содержащего фосфотирозин (cytoplasmic phosphotyrosine-containing protein), названного Disabled-1, также приводит к *reeler* фенотипу[56], как и генетическое выключение (knock-out) рецептора липопротеинов низкой плотности вместе с рецепторами 2 типа к аполипопротеину E[57]. На основании этого можно судить о том, что эти три белка являются частью внутриклеточного механизма, который позволяет кортикальным клеткам распознавать сигнал с reelin-белка, передающийся через внеклеточный матрикс, и использовать этот сигнал для установления правильной структуры слоев коры. Большое количество других генетических мальформаций в коре ГМ человека связано с нарушением миграции нейронов[21].

Влияние локальных сигналов на корковую архитектуру

Примером способности корковых нейронов изменять свое строение после того, как они мигрировали прочь от вентрикулярной зоны, является эксперимент, в котором кусочек развивающейся зрительной коры был пересажен в область представления вибрисс соматосенсорной коры крысы[58, 59]. Нейроны в трансплантанте реорганизовались и сформировали четко различимую колончатую структуру, характерную для их нового месторасположения (глава 18), образуя фенотип, не характерный для зрительной коры. Таким образом, внутренние влияния могут определять особенности фенотипов корковых нейронов.

Гормональный контроль за развитием нервной системы

В некоторых областях ЦНС развитие нейронов находится под гормональным контролем. Это особенно заметно в областях мозга, определяющих сексуальное поведение. Например, у таких певчих птиц, как канарейки, ядро высшего вокального центра (ВВЦ, high vocal center, HVC) играет ключевую роль в приобретении и запоминании песни — что является исключительно мужским поведением[60]. Эта зона мозга больше развита у самцов, чем у самок (рис. 23.14). Однако пение можно вызывать даже у взрослых самок введением тестостерона, в результате чего ядро ВВЦ и другие структуры, связанные с воспроизведением песни, увеличиваются.

Ядра ВВЦ у взрослых самцов и самок канарейки являются особенными центрами, так как там происходит постоянный кругооборот нейронов[61, 62]. Образование (recruitment) новых нейронов ВВЦ у самцов происходит максимально осенью и весной, сразу после пика гибели старых нейронов. Таким образом, в это время происходит модификация их песен для нового брачного сезона. Период гибели нейронов совпадает с падением уровня тестостерона, а образование новых — с его пиком. Назначение тестостерона самкам приводит к увеличению образования новых нейронов в ВВЦ, которые, как их предшественники, получают определенные синаптические сигналы и посылают свои аксоны к определенным мишеням. Эти удивительные наблюдениям показывают, что в зрелом мозге возможно не только образование новых нейронов, но также их включение в сложно устроенную и функционирующую систему, что приводит к перемоделированию такого свойственного птицам поведения, как их песни.

Стволовые нервные клетки

ВВЦ певчих птиц является не единственным примером того, когда новые нейроны включаются в состав нервной системы взрослых жи-

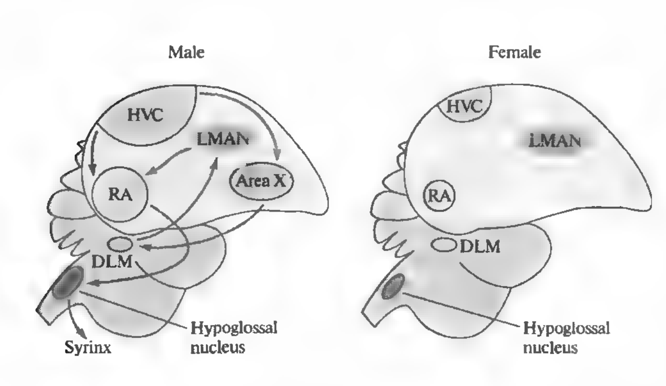


Рис. 23.14. Половой диморфизм в головном мозге птиц. Схематическая диаграмма основных зон мозга и путей, участвующих в формировании песни у певчих птиц. Высший вокальный центр (HVC), крепкое ядро архистриатума (RA) и подъязычное ядро формируют задний вокальный моторный путь (показано черным). HVC, зона X, медиальное дорзолатеральное ядро таламуса (DLM) и латеральное магноцеллюлярное ядро переднего неостриатума (LMAN) образуют передний путь (показано серым). HVC, подъязычное ядро и RA имеют значительно большие размеры у самцов; зона X не обнаруживается в мозге самок зябликов.

Fig. 23.14. Sexual Dimorphism in the Avian Brain. Schematic diagram of the major brain areas and pathways involved in production of song in songbirds. The higher vocal center (HVC), robust nucleus of the archistriatum (RA), and hypoglossal nucleus form the posterior, vocal motor pathway (black). The HVC, area X, medial dorsolateral nucleus of the thalamus (DLM), and lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (LMAN) form the anterior pathway (grey). HVC, hypoglossal nucleus, and RA are significantly larger in male birds; area X has not been observed in brains of female finches.

вотных. Нейроны также постоянно обновляются в гиппокампе и обонятельной луковице у взрослых млекопитающих[63, 64]. Однако как образуются эти клетки? **Нервные стволовые клетки**, которые обладают способностью к самообновлению, были выделены из стенок желудочков и из гиппокампа взрослого мозга и было прослежено их размножение *in vitro*[65]. Эти клетки могут дифференцироваться в нейроны, олигодендроциты и астроциты. Нейроны, постоянно добавляющиеся в обонятельной луковице *in vivo*, происходят из медленно делящихся стволовых клеток самого внутреннего, эпендимального слоя стенок боковых желудочков (остаток начальной вентрикулярной зоны)[66]. Один из потомков каждого клеточного деления направляется в субэпендимальную зону, чтобы стать там клеткой-предшественницей. Клетка-предшественница быстро делится, образуя незрелые нейроны, которые мигрируют в ростральном направлении в область луковицы, где они дифференцируются в интернейроны и интегрируются в имеющиеся сети[67]. При повреждении ЦНС клетка-потомок стволовых клеток становится астроцитом, а не нейроном, мигрирует в область повреждения и принимает участие в образовании рубца в области повреждения. Таким образом, судьба потомка стволовой клетки у взрослых может быть изменена под влиянием внешних сигналов.

Стволовые нервные клетки, таким образом, представляют собой популяцию клеток, способных размножаться в культуре и подвергаться дифференцировке либо в глиальные клетки, либо в нейроны. Это обеспечивает возможность использования этих клеток в качестве резерва нейронов или глиальных клеток при лечении заболеваний нервной системы, при которых наблюдается гибель клеток ГМ или их дисфункция (глава 24)[68].

Контроль за фенотипом нейронов в ПНС

Сходны ли механизмы, определяющие судьбу клеток в ПНС позвоночных с механизмами, определяющими развитие ЦНС? Например, какую роль играют происхождение клеток, время их образования и локальные сигналы в определении пути развития периферических нейронов и глиальных клеток? Запрограммированы ли клетки-предшественницы на формирование клеток определенного типа, например клеток автономной, а не сенсорной системы, или на использование этими клетками ацетилхолина, а не норадреналина, в качестве трансмиттера?

Подобные вопросы изучались в нервной системе цыплят и перепелок Ле Дуарином, Вестоном и другими[69, 70]. В эмбрионе позвоночных клетки нервного гребня, расположенные в разных местах вдоль нервной оси, образуют различные типы клеток ПНС (рис. 23.15А). Для изучения того, определен ли фенотип клеток, развивающихся из нервно-

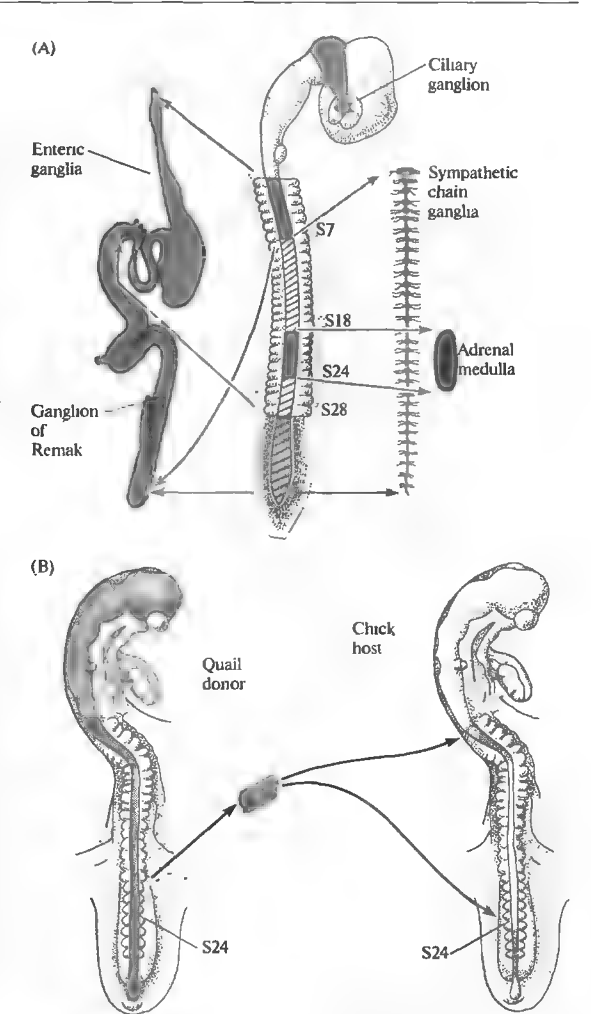


Рис. 23.15. Судьба клеток нервного гребня определяется окружением. (A) Клетки нервного гребня образуют большое количество различных периферических ганглиев. Ресничный ганглий образован клетками из мезенцефального нервного гребня. Ганглий Ремака и кишечные ганглии тонкой кишки образуются из клеток вагальной (сомиты 1–7) и люмбосакральной (каудальнее S28) областей нервного гребня. Ганглии симпатической цепочки происходят из всех областей нервного гребня каудальнее S5. Надпочечник заселяется клетками нервного гребня из S18–S24. (B) Если клетки нервного гребня из S18–S24, которые должны образовать надпочечник, пересадить от донора-перепелки в вагальную или люмбосакральную область эмбриона цыпленка, они будут следовать пути развития, характерному для своего нового положения и заселят ганглий Ремака или кишечный ганглий тонкой кишки.

Fig. 23.15. The Fate of a Neural Crest Cell is determined by environmental cues. (A) Neural crest cells give rise to a variety of peripheral ganglia. The ciliary ganglion is formed by cells from the mesencephalic neural crest. The ganglion of Remak and the enteric ganglia of the gut are formed by cells from the vagal (somites 1–7) and lumbosacral (caudal to S28) regions of the neural crest. The ganglia of the sympathetic chain are derived from all regions of the neural crest caudal to S5. The adrenal medulla is populated by crest cells from S18–S24. (B) If crest cells from S18–S24, which are destined to form the adrenal medulla, are transplanted from a quail donor to the vagal or lumbosacral region of a host chick embryo, they will adopt the fate appropriate to their new location and populate the ganglion of Remak and the enteric ganglia of the gut. (After Le Douarin, 1986.)

го гребня, уже на ранних стадиях развития или он может изменяться при перемещении клеток в другое место вдоль нервной оси, Ле Дуарин пересаживал клетки из одного региона нервного гребня в другой регион эмбриона-хозяина и затем исследовал развитие пересаженных клеток. В этих экспериментах клетки доноры брались из эмбриона перепелки и затем имплантировались в эмбрион-хозяин цыпленка таким образом, чтобы пересаженные клетки можно было различить по очевидным цитологическим отличиям между клетками перепелки и цыпленка (рис. 23.15B). После пересадки клетки куропатки развивались согласно своему новому расположению. Например, клетки, взятые из области, которая при нормальном развитии образовывала надпочечник, вместо этого образовывали иннервацию кишечника.

Близким вопросом является то, определен ли фенотип клеток нервного гребня до того, как клетки мигрируют прочь от нервной трубки или после того, как они достигнут своего окончательного месторасположения на периферии. Ответ на этот вопрос получен в исследованиях клеток нервного гребня, выделенных из одного периферического месторасположения: предшественника (primordium) надпочечника эмбриона млекопитающих[71)]. В культуре эти клетки образуют либо хромаффинные клетки, либо клетки мозгового вещества надпочечников, либо адренергические симпатические нейроны. Глюкокортикоиды (синтезируемые клет-

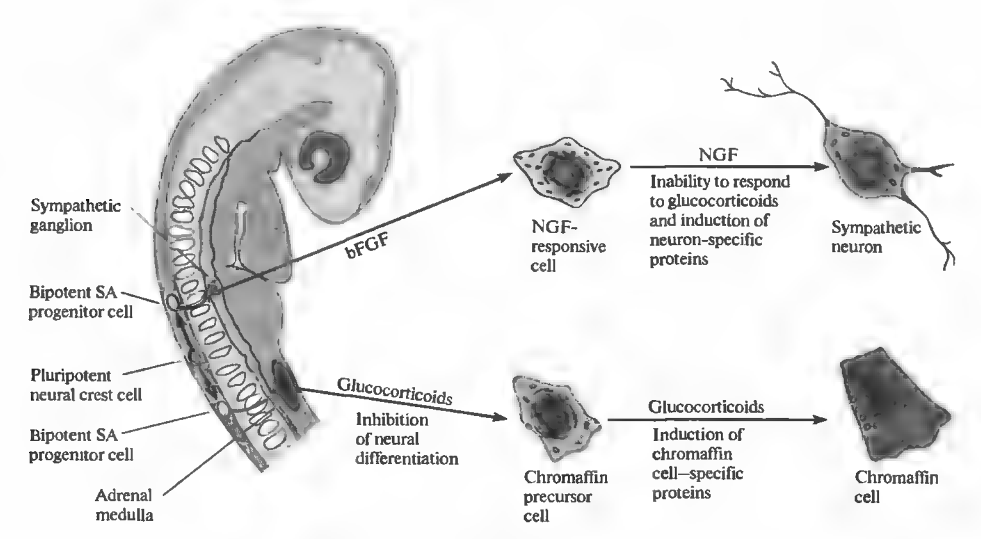


Рис. 23.16. Определение направления развития клеток нервного гребня, образующих симпатоадреналовую (SA) систему. Плюрипотентные клетки нервного гребня образуют бипотентные SA клетки-предшественники. Судьба SA клеток-предшественников зависит от сигналов извне. SA клетки-предшественники, которые мигрируют в область надпочечника, подвергаются влиянию глюкокортикоидов, ингибирующих нервную дифференцировку и способствующих дифференцировке их в хромаффинные клетки. Альтернативным образом, SA клетки-предшественницы, которые мигрируют в область развивающейся симпатической цепочки, подвергаются воздействию основного фактора роста фибробластов, который приводит к экспрессии ФРН в SA предшественниках. Последующее действие ФРН приводит к тому, что клетки, нечувствительные к дифференцировке в ответ на глюкокортикоиды, начинают дифференцироваться в симпатические нейроны.

Fig. 23.16. Cell Fate Determination in the neural crest sympathoadrenal (SA) lineage. Pluripotent neural crest cells give rise to bipotent SA progenitor cells. The fate of SA progenitor cells depends on environmental signals. SA progenitors that migrate to the region of the adrenal medulla are exposed to glucocorticoids, which inhibit neural differentiation and induce chromaffin cell differentiation. Alternatively, SA progenitor cells that migrate to the region of the developing sympathetic chain are exposed to basic fibroblast growth factor (bFGF), which induces the expression of nerve growth factor (NGF) receptors in the SA progenitors. Subsequent exposure to NGF renders the cells insensitive to glucocorticoid-induced differentiation and induces them to differentiate as sympathetic neurons.

ками коры надпочечника) вызывают экспрессию ферментов, специфических для хромаффинных клеток (рис. 23.16). И наоборот, два белка, присутствующие в местах образования симпатических ганглиев, называемые основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF) и фактор роста нерва (nerve growth factor, NGF), в культуре клеток вызывают дифференцировку клеток-предшественниц в симпатические нейроны. Таким образом, фенотип клеток нервного гребня может быть определен после того, как они мигрировали прочь от нервной трубки, при помощи факторов, находящихся на периферии.

Выбор трансмиттера в ПНС

При пересаживании клеток нервного гребня в относительно раннем периоде их дальнейшее развитие может изменяться вплоть до того, что они могут в дальнейшем использовать абсолютно другой трансмиттер, например ацетилхолин, вместо норадреналина. В некоторых случаях такая смена медиатора происходит в ходе нормального развития. Например, симпатические нейроны, иннервирующие потовые железы, изначально синтезируют норадреналин, но в период между второй — третьей неделями постнатального развития факторы, выделяемые железой, приводят к тому, что они начинают вырабатывать ацетилхолин[72]. На более поздних стадиях клетки нервного гребня становятся уже слишком зрелыми и теряют способность менять свою дифференцировку в соответствии с изменениями окружающей среды.

Изучение механизма смены трансмиттера проводилось на культурах клеток симпатических ганглиев. Когда нейроны выделялись из верхнего шейного ганглия новорожденного

Рис. 23.17. Отдельные нейроны симпатических ганглиев способны выделять как ацетилхолин, так и норадреналин в синапсах на культуре клеток сердца. (А) Микрокультура, содержащая отдельные симпатические нейроны, выращенные на островке клеток сердечной мышцы. (В) Короткая серия импульсов в нейроне (10 Гц, показано в виде отклонений нижней записи) вызывает ингибирование спонтанной активности миоцита из-за высвобождения АХ (верхняя запись). (С) Добавление атропина (10^{-7} М) блокирует тормозный холинергический ответ, что приводит к проявлению возбуждающего эффекта, вызванного высвобождение норадреналина.

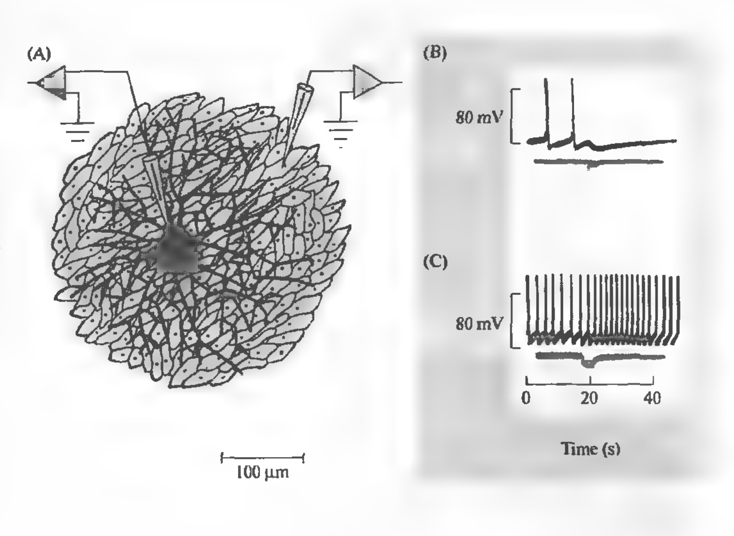
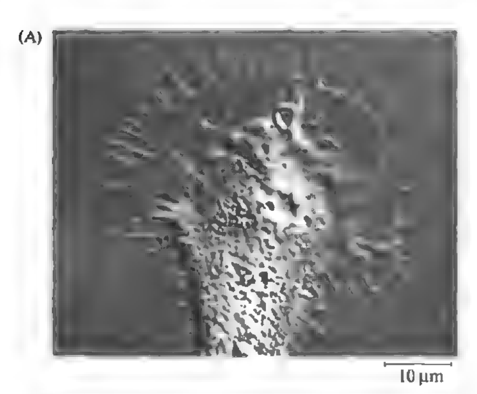
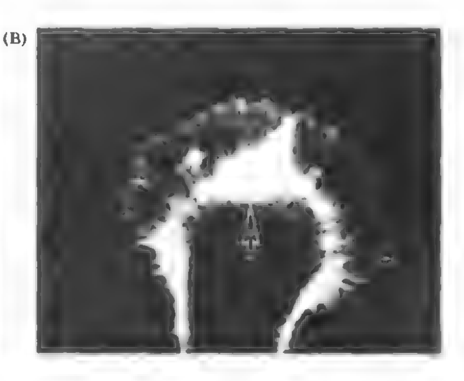


Fig. 23.17. Single Neurons from Sympathetic Ganglia Can Release Both Acetylcholine and Norepinephrine at synapses on heart cells in culture. (A) A microculture containing a single sympathetic neuron grown on an island of cardiac muscle cells. (B) A brief train of impulses in the neuron (10 Hz, deflection of lower trace) produced inhibition of spontaneous myocyte activity due to release of ACh (upper trace). (C) Addition of atropine (10^{-7} *M*) blocked the inhibitory cholinergic response, revealing an excitatory effect, which is due to the release of norepinephrine. (After Furshpan et al., 1976.)

крысенка и выращивались в культуре в отсутствие клеток других типов, они все содержали фермент тирозингидроксилазу, синтезировали и образовывали запасы катехоламинов[73]. Однако, если нейроны выращивались в присутствии определенных типов ненейрональных клеток, таких как клетки сердечной мышцы или потовых желез, нейроны постепенно переставали синтезировать катехоламины и начинали синтезировать вместо этого фермент холинацетилтрансферазу и ацетилхолин[74]. Для того, чтобы окончательно установить, что подобные изменения возможны в одиночных нейронах, они культивировались на микроостровках клеток миокарда (рис. 23.17)[75]. Нейроны быстро вытягивали свои отростки и образовывали синаптические контакты с клетками миокарда. Сначала эти синапсы были чисто адренергическими, затем, по прошествии нескольких дней, клетки начинали выделять вместе норадреналин и ацетилхолин. В конечном счете передача становилась полностью холинергической.

Фактор, который вызывал холинергическую дифференцировку симпатических нейронов, был выделен из среды клеток сердца и клонирован[76]. Оказалось, что это фактор ингибирующий развитие лейкемии (leukemia inhibitory factor, LIF), белок, который ранее был описан по его способности индуцировать дифференцировку клеток иммунной системы. Два других близких цитокина, цилиарный нейротрофический фактор (ciliary neurotrophic factor, CNTF) и кардиотрофин-1, как было обнаружено, вызывают сходные эффекты в культуре нейронов[72]. Все эти три фактора активируют рецепторный комплекс (называемый LIFRβ-gp130 рецептор), блокирование которого угнетает развитие холинергических свойств нейронов, культивируемых вместе с клетками потовых желез. Однако иннервация потовых желез у мутантных мышей, не имеющих LIF и CNTF, формируется нормально, а результаты других экспериментов заставляют предположить, что кардиотрофин-1 не является фактором, который может вызывать переключение в клеточной иннервации потовых желез *in vivo*. Хотя еще не описано генетическое выключение всех трех генов, вполне возможно, что скоро будет описан новый, еще не идентифицированный фак-

(A)


(B)


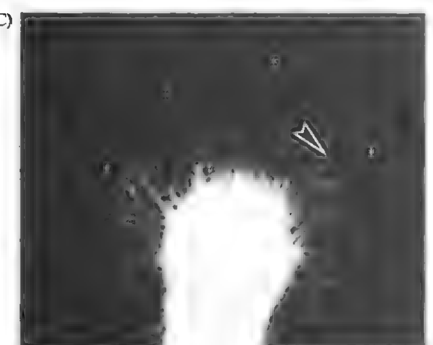
(C)


Рис. 23.18. Морфология конусов роста. (A) Конус роста в интерференционном микроскопе. (B) Флуоресцентная микрофотография, показывающая распределение филаментного актина, визуализируемого вместе со связанным с родамином фаллоидином. Актиновые филаменты ориентированы в виде филоподий, или микроспайков, на периферии от конусов роста; случайным образом ориентированные филаменты часто концентрируются вокруг центрального домена (показано стрелкой). (C) Распределение микротрубочек, визуализированное при помощи антитубулиновых антител и вторичных антител, связанных с флуоресцеином. Микротрубочки сконцентрированы в аксоне. Большинство из них прерывается на центральном домене конуса роста; некоторые (показано стрелкой) направляются к границам конуса роста (показано звездочками).

Fig. 23.18. The Morphology of Growth Cones. (A) Growth cone observed by differential interference contrast microscopy. (B) Fluorescence micrograph showing the distribution of filamentous actin visualized with rhodamine-conjugated phalloidin. Actin filaments align with filopodia, or microspikes, in the periphery of the growth cone; randomly oriented filaments are often concentrated near the central domain (arrow). (C) Microtubule distribution visualized with antitubulin antibodies and fluorescein-conjugated secondary antibodies. Microtubules are concentrated in the axon. Most terminate in the central domain of the growth cone; some (arrowhead) extend toward the growth cone margin (asterisks). (After Forscher and Smith, 1988; micrographs kindly provided by S. J. Smith.)

тор потовых желез, являющийся лигандом для LIFRβ-gp130 рецептора.

§ 4. Рост аксона

Конус роста, удлинение аксона и роль актина

Кончик растущего аксона удлиняется, образуя конус роста. Рамон-и-Кахаль первым обнаружил, что конус роста является частью аксона, ответственной за навигацию и удлинение его в направлении конечной цели (рис. 23.18). Конус роста удлиняется и сокращается за счет широких пластинок, называемых ламмелиподиями, и тонких, остроконечных выпячиваний, называемых филоподиями. Филоподии достигают размеров в несколько десятков микрометров и могут удлиняться и сокращаться, как бы ощупывая субстрат во всех направлениях[77)]. Филоподии адгезируют к определенному субстрату и тянут конус роста в этом направлении.

Актин играет ключевую роль в подвижности конуса роста (рис. 23.19)[78)–80)]. Как ламеллиподии, так и филоподии богаты филаментным актином и веществами, ингибирующими полимеризацию актина, такими как грибной токсин цитохалазин B, обездвиживаюший конусы роста. Выпячивание и ретракция ламеллиподий и филоподий, а также движение вперед самого конуса роста, скорее всего, управляется двумя процессами: (1) полимеризацией и разборкой актиновых филаментов и (2) зависимой от миозина транслокацией актиновых филаментов прочь от ведущего края конуса роста. Оба процесса ис-

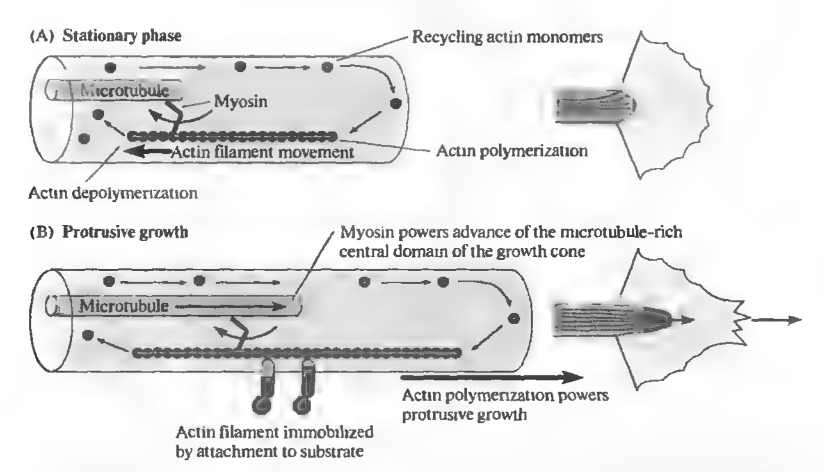


Рис. 23.19. Модель подвижности конусов роста на основе актина. (A) Поперечный срез (слева) и вид сверху (справа) на конус роста в стационарной фазе. Миозин, связанный с микротрубочками, обеспечивает движение актиновых филаментов в направлении назад, в то время как в филаментах постоянно происходит процесс полимеризации со стороны ведущего края конуса роста и деполимеризация в центре. (B) Аналогичные изображения конуса роста во время роста. Актиновые филаменты иммобилизировались присоединением к субстрату. Полимеризация актина в этом случае приводит к продвижению конуса роста, в то время как миозин обеспечивает движение микротрубочек вперед, продвигая центральный домен конуса роста.

Fig. 23.19. Model for Actin-Based Motility of Growth Cones. (A) Cross section (left) and top view (right) of a growth cone in stationary phase. Microtubule-attached myosin powers rearward movement of actin filaments, while filaments are undergoing continuous polymerization at the leading edge of the growth cone and depolymerization centrally. (B) Similar views of a growth cone during protrusive growth. Actin filaments are immobilized by attachment to the substrate. Actin polymerization now causes protrusion of the growth cone, while myosin cycling moves microtubules forward, advancing the central domain of the growth cone. (After Suter et al., 1998.)

пользуют энергию гидролиза АТФ и могут управляться белками, связывающими актин. Кальций, протеинкиназы и другие внутриклеточные вторичные посредники управляют активностью актин-связывающих белков. Например, остановка роста и ретракция конуса роста, два частых события в процессе роста аксонов, связаны с входящим током кальция и увеличением частоты кратковременных повышений концентрации кальция в цитоплазме клетки[81, 82].

Молекулы адгезии клетки и внеклеточного матрикса и рост аксона

Молекулы клеточной адгезии управляют ростом аксона, обеспечивая наиболее благоприятное окружение для вытягивания конуса роста. Клеточные молекулы адгезии представляют собой трансмембранные или связанные с мембраной гликопротеины, характеризующиеся структурными мотивами своих внеклеточных частей, которые во многом гомологичны постоянным доменам иммуноглобулинов и фибронектина 3 типа (рис. 23.20). Представителями надсемейства этих иммуноглобулинов (Ig) являются клеточные молекулы адгезии (N-CAM), молекулы адгезии нейроглии CAM (NgCAM), TAG-1, MAG, и DCC[83]. Эти молекулы обеспечивают адгезию клеток друг к другу посредством гетерофильных связей между различными надсемействами иммуноглобулинов (например, связь между NrCAM и TAG-1). Дополнительно присутствующей везде молекулой клеточной адгезии является молекула N-кадгерина (N-cadherin, рис. 23.20), которая обеспечивает кальций-зависимую адгезию между клетками[84].

В культуре клеток экспрессия N-CAM и N-кадгерина в клетках приводит к их агрегации, вытягиванию аксонов в сторону клеточных субстратов, но не субстратов внеклеточного матрикса, а также соединению отдельных растущих аксонов в пучки (фасцикулы, fascicles). Стимуляция роста аксонов молекулами клеточной адгезии не обеспечивается просто «липкостью» субстрата; она управляется активацией рецепторов, связанных с тирозинкиназой, например рецептора к фактору

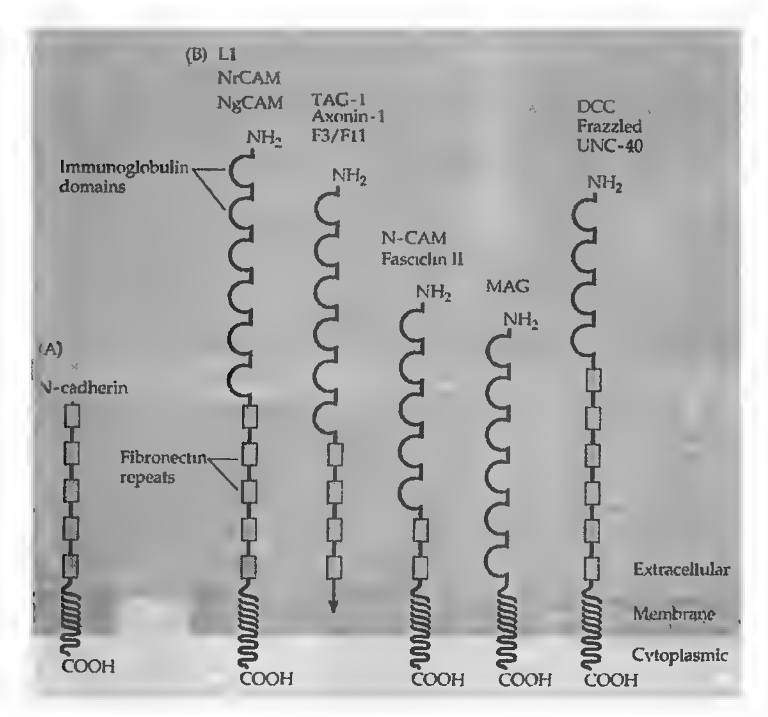


Рис. 23.20. Два класса молекул адгезии нервных клеток. (А) N-кадгерин способствует гомофильной, кальций-зависимой адгезии. (В) Члены надсемейства иммуноглобулинов характеризуются многочисленными повторами связанных друг с другом дисульфидными мостиками циклов, которые гомологичны доменам, впервые описанным в постоянной части молекул иммуноглобулина. Многие из этих молекул клеточной адгезии также содержат несколько доменов, сходных с повторами в фибронектине III типа (показано в виде прямоугольников). У различных видов животных имеется большое количество гомологичных белков со сходными именами.

Fig. 23.20. Two Classes of Neural Cell Adhesion Molecules. (A) N-cadherin mediates homophilic, calcium-dependent cell adhesion. (B) Members of the immunoglobulin superfamily are characterized by multiple repeats of disulfide-linked loops homologous to domains first characterized in the constant region of immunoglobulin molecules. Many of these cell adhesion molecules also contain multiple domains similar to the type III repeat of fibronectin (rectangles). Multiple names denote homologous proteins in different species.

роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF). Рецептор FGF включает внутриклеточный каскад, связанный с фосфорилированием тирозина, что приводит к удлинению аксона. Белковая тирозинфосфатаза, фермент, удаляющий остатки фосфата с тирозина, также участвует в регулировании этих сигналов.

Молекулы адгезии внеклеточного матрикса, включая ламинин, фибронектин, тенасцин (J1, цитотактин), а также перлецан, тоже являются благоприятным субстратом для роста нервных отростков[85, 86]. Эти гликопротеины с большой массой имеют две или более сходные субъединицы, удерживаемые вместе благодаря дисульфидным мостикам (рис. 23.21). Каждая субъединица характеризуется повторяющимися структурными мотивами. Белки внеклеточного матрикса взаимодействуют с клетками через семейство рецепторов, называемых интегринами. Было идентифицировано большое количество изоформ α и β-субъединиц интегрина. Каждая $\alpha\beta$ комбинация приводит к формированию рецепторов с различными свойствами. Интегрины обеспечивают структурные связи между белками внеклеточного матрикса и внутриклеточным актиновым цитоскелетом, регулируя форму клетки и ее миграцию. Кроме того, они активируют внутриклеточные сигнальные пути, которые управляют ростом клетки, пролиферацией и дифференцировкой[87].

Исследования при помощи специальных блокирующих антител показывают, что конусы роста редко используют только один субстрат для своего движения; несколько типов молекул адгезии клетки и внеклеточного матрикса могут обеспечивать рост нервных отростков у определенных типов нейронов. Например, для полного ингибирования роста аксонов в сторону шванновской клетки необходимо применять одновременно антитела к L1/NgCAM, N-кадгерину и интегринам. Один тип антител сам по себе не может помешать росту аксона[88, 89].

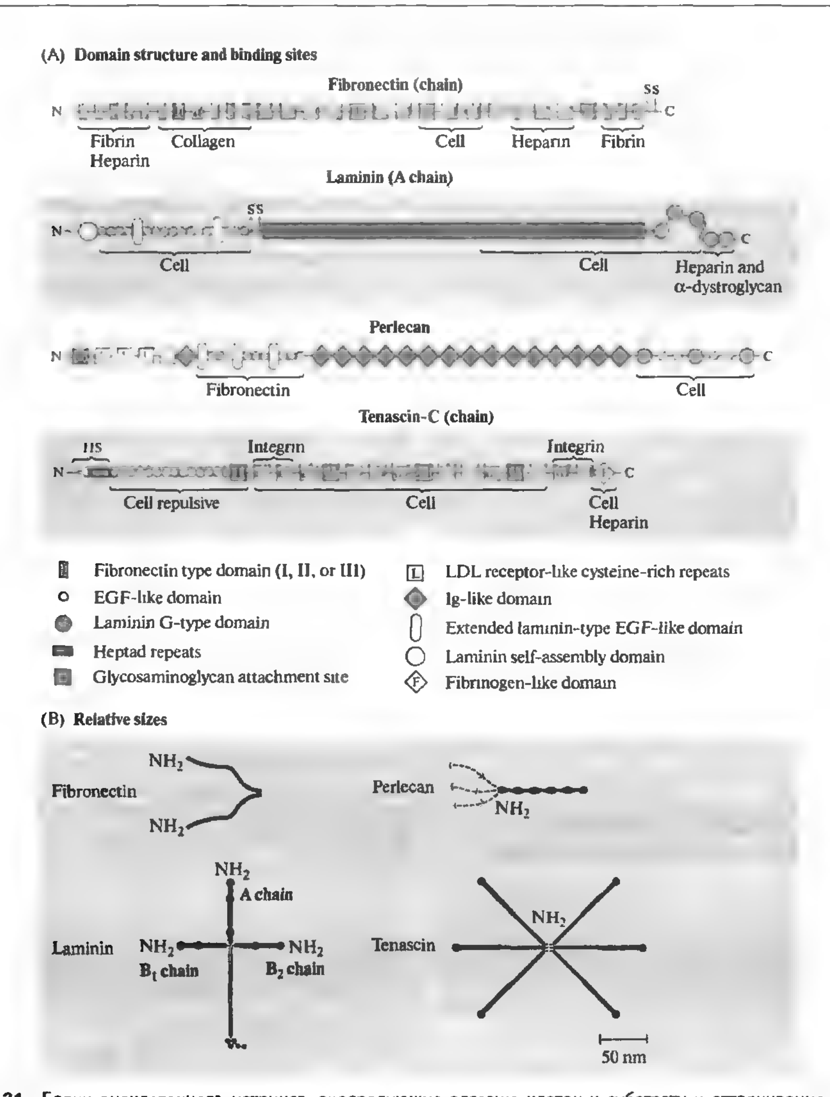


Рис. 23.21. Белки внеклеточного матрикса, опосредующие адгезию клеток к субстрату и отталкивание. (А) Схематическое представление доменной структуры цепей, состоящей из фибронектина, ламинина (А цепь), перцелана и тенасцина-С, а также участков, к которым присоединяются клетки, коллаген, гепарин, фибронектин, интегрин, фибрин и альфа-дистрогликан. S указывает на расположения остатков цистеина, которые образуют дисульфидные мостики между цепочками. Тенасцин-С содержит как связывающие, так и отталкивающие домены; основной его эффект, однако, отталкивание клеток и конусов роста. (В) Молекулы, изображенные в определенном масштабе. Все, кроме перцелана, являются олигопротеинами; цепи связаны друг с другом дисульфидными мостиками. Пунктирной линией показан гепарансульфат 90 и 170 нм длиной, связанный с N-терминальным доменом перцелана. (Из Engel, J., 1992.)

Fig. 23.21. Extracellular Matrix Proteins that mediate cell–substrate adhesion and repulsion. (A) Schematic representations of the domain structure of the chains that comprise fibronectin, laminin (A chain), perlecan, and tenascin-C, and the sites at which cells, collagen, heparin, fibronectin, integrin, fibrin, and α-dystroglycan bind. S indicates positions of Cys residues involved in interchain disulfide bridging. Tenascin-C contains both binding and repulsive domains; the predominate effect of the whole protein is repulsion of cells and growth cones. (B) Molecules drawn approximately to scale. All but perlecan are oligomeric proteins; the chains are linked by disulfide bonds. Dashed lines indicate the 90- to 170-nm-long heparan sulfate chains attached to the N-terminal domain of perlecan. (After Engel, J., 1992.)

§ 5. Управление ростом аксона

Аксоны нервных клеток могут достигать 1 метра и более в длину, образуя синапсы в определенном месте на строго определенной клетке в области, где имеется большое количество других потенциальных клеток-мишеней. Две основные теории, касающиеся того, каким образом устанавливается такая специфичность в синаптических связях во время развития, были предложены в первой четверти двадцатого века. Согласно одной, нейроны и их мишени заранее запрограммированы на образование определенных синаптических связей[90]. Другая теория считает, что первоначально связи устанавливаются более или менее случайно, а затем часть из них реорганизовывается благодаря влияниям на нейроны со стороны клеток-мишеней, в результате чего происходит устранение ошибочных синапсов и гибель неправильно соединенных клеток[91]. Экспериментальные доказательства, полученные к настоящему времени, говорят в пользу того, что рост аксонов и образование синаптических связей является селективным процессом; аксон направляется строго к своей цели благодаря определенным сигналам в своем окружении[92].

Навигация аксона, зависящая и не зависящая от клетки-мишени

Какие внеклеточные сигналы управляют конусом роста? Рамон-и-Кахаль сначала предложил **хемоаттрактантную модель** управления аксоном, согласно которой конусы роста аксонов следуют по градиенту концентрации некоторых молекул, вырабатываемых клетками-мишенями. Такой механизм возможен для роста аксона, когда расстояние между телом нейрона и его мишенью очень короткое. Например, Лумсден и Дэвис изучали рост аксонов из ганглия тройничного нерва, расположенного в голове мыши, в соседние эпителиальные ткани, расстояние до которых составляло менее 1 мм[93] (эти аксоны в конечном счете образовывали сенсорную иннервацию вибрисс, глава 18). Если развивающийся ганглий тройничного нерва помещался в культуру вблизи эксплантантов из нескольких периферических тканей, нервные отростки росли из ганглия в направлении собственной клетки-мишени, игнорируя другие ткани. Эксплантанты эпителия ткани-мишени оказывали подобное действие на рост аксонов только в том случае, если они брались у эмбриона в период становления иннервации.

В противоположность этому, способность аксонов спинальных мотонейронов расти в направлении конечностей не зависит от наличия мышечной клетки-мишени. Это было показано путем удаления в раннем периоде сомита, из которого развивается мускулатура конечностей[94]. Аксоны мотонейронов направляются нормально из спинного мозга, врастают в конечность и образуют определенный паттерн мышечных нервов, даже в отсутствие мышцы. Таким образом, факторы, которые управляют ростом аксонов мотонейронов к определенной мишени на конечности, не выделяются мышцами, с которыми аксоны в конечном итоге образуют связи.

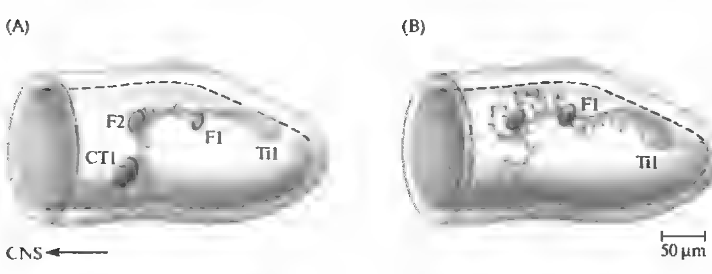


Рис. 23.22. Конусы роста периферических нейронов используют клетки-ориентиры для навигации в конечностях кузнечика. (A) В нормальном эмбрионе аксоны Ti1 нейрона встречают на своем пути в центральную нервную систему серию клеток-ориентиров: клетки F1, F2 и две клетки CT1. (B) Если CT1 клетку убить на ранней стадии развития, нейрон Ti1 образует несколько аксональных веточек из точки, где находится F2, и конусы роста направляются в неправильном направлении.

Fig. 23.22. Growth Cones of Peripheral Neurons Rely on Guidepost Cells to navigate through the limb of the grasshopper. (A) In normal embryos, the axon of the Ti1 neuron encounters a series of guidepost cells on its route to the central nervous system: F1, F2, and two CT1 cells. (B) If the CT1 cells are killed early in development, the Ti1 neuron forms several axonal branches at the site of cell F2, with growth cones extending in abnormal directions. (After Bentley and Caudy, 1983.)

Навигация по клеткам-ориентирам (guidepost cells)

Когда дистанция от нейрона до его цели составляет больше чем несколько сотен микрон, его путь обозначен специальными промежуточными целями. Например, конус роста, идущий от сенсорной клетки конечностей у развивающегося кузнечика, делает несколько резких поворотов на своем пути в ЦНС (рис. 23.22)[95]. Эти повороты происходят в тот момент, когда конус роста касается так называемых **клеток-ориентиров** (guidepost cells)[96, 97]. Такое поведение указывает на наличие взаимодействия с клетками-ориентирами, ответственными за перенаправление конусов роста. Этими клетками чаще всего являются незрелые нейроны. Эти взаимодействия можно продемонстрировать при помощи удаления клеток-ориентиров лучом лазера до того, как их достигнет конус роста. В этом случае не происходит соответствующего изменения в траектории движения конуса роста.

Синаптические взаимодействия с клетками-ориентирами

В некоторых случаях аксоны образуют кратковременные синаптические контакты с клетками-ориентирами во время развития. В развивающемся гиппокампе, например, аксоны из энторинальной коры сначала образуют синапсы с временной популяцией нейронов, клетками Кахаля—Ретциуса[98, 99]. Позднее, по мере появления гранулярных клеток и их созревания, энторинальные аксоны покидают клетки Кахаля—Ретциуса и образуют связи с дендритами гранулярных клеток. После этого клетки Кахаля—Ретциуса исчезают. В другом примере аксоны нейронов из ядра ЛКТ в зрительной системе млекопитающих достигают развивающуюся корковую пластинку раньше, чем образуются их синаптические мишени — пирамидные клетки слоя 4. Поэтому аксоны ядра ЛКТ образуют синапсы с нейронами подпластинки[100], которые образуются в раннем эмбриогенезе. Нейроны подпластинки лежат под развивающейся корковой пластинкой, и им суждено исчезнуть вскоре после рождения[101]. Через несколько недель, когда пирамидные клетки слоя 4 достигают своего месторасположения в коре, аксоны из ЛКТ разрывают свои связи с нейронами подпластинки и направляются в кору, чтобы образовать связи, характерные для взрослого животного. Если нейроны подпластинки удалить в раннем периоде развития местной аппликацией нейротоксинов, аксоны ядра ЛКТ прорастают за пределы развивающейся зрительной коры и не могут образовать синаптических связей со своими мишенями[102].

Механизмы управления аксоном

Молекулы, которые управляют конусом роста, действуют четырьмя основными путями: как **аттрактанты** или **репелленты**, на **короткой** или **длинной** дистанции. В табл. 23.1 представлено большое количество управляющих молекул и рецепторов, которые мы обсуждаем в этой главе.

Некоторые коротко-дистантные сигналы управления аксоном обеспечиваются посредством контакта конуса роста с клеточной поверхностью или с белками адгезии внеклеточного матрикса, которые были описаны ранее в этой главе как промоторы роста аксона[103]. Молекулы адгезии и их рецепторы могут также играть ведущую роль в связывании отдельных аксонов в пучки (так называемая фасцикуляция). Характер роста аксона и иннервация клетки-мишени *in vivo* и в культуре клеток нарушалась при изменении активности специфических молекул адгезии или их рецепторов, в генетических экспериментах с выключением определенных генов, а также при добавлении определенных типов антител[104)–106].

Другое влияние молекул внеклеточного матрикса на растущий аксон показано в экспериментах на отдельных клетках, выделенных из ЦНС пиявки и растущих в культуре (рис. 23.23)[107]. Субстраты, которые содержат тенасцин или ламинин, способствуют не только быстрому образованию нервных отростков у нейронов пиявки, но также влияют на характер роста этих отростков и на распределение кальциевых каналов в клетке. Различные нейроны по-разному отвечают на определенные молекулы внеклеточного матрикса. Таким образом возникает экономная схема, когда несколько молекул адгезии могут обеспечивать разнообразные эффекты.

С другой стороны, изучение поведения конуса роста в клеточной культуре показывает, что клетки и молекулы адгезии внеклеточного матрикса не являются сигналами на длинных дистанциях. Например, конусы роста не направляются по или против градиентов концентрации молекул адгезии клетки или матрикса[108]. Конусы роста также не используют различия в силе адгезии с разными

Таблица 23.1. Примеры хемоаттракции и хемоотталкивания на большой и короткой дистанции.

Table 23.1. Examples of short- and long-range chemoattraction and chemorepulsion.

Ligand	Receptor/ligand	Attraction/repulsion
Short-range (contact mediated)		
TAG-1	NrCAM	Attraction
Slit	Robo	Repulsion
N-CAM	N-CAM	Attraction
ECM adhesion proteins	Integrins	Attraction
Ephrins	Eph receptors	Repulsion
Long-range (diffusible ligand)		
Netrin	DCC	Attraction
Semaphorins	Neuropilins	Repulsion
Slit	?	Repulsion
Netrin	?	Repulsion

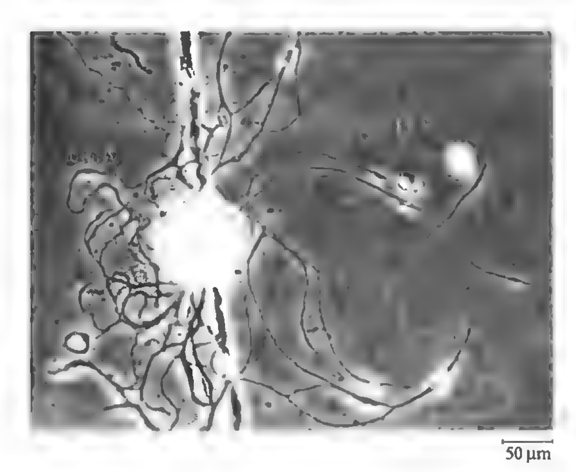


Рис. 23.23. Молекулы внеклеточного матрикса определяют паттерн роста нервных отростков в культуре нейронов пиявки. Одиночный нейрон выращен в клеточной культуре на субстрате определенного паттерна. С левой стороны край чашки был покрыт конканавалином А (Con А), а с правой стороны экстрактом, содержащим внеклеточный матрикс (ECM) из глиальных капсул ганглиев пиявки.

Fig. 23.23. Extracellular Matrix Molecules Determine the Pattern of neurite outgrowth from leech neurons in culture. A single neuron grown in cell culture on a patterned substrate. On the left side of the border the plate was coated with Concanavalin A (Con A), on the right with extracellular matrix (ECM)-containing extracts of leech ganglion capsules. (From Grumbacher-Reinert, 1989; kindly provided by S. Grumbacher-Reinert.)

поверхностями для навигации; все молекулы адгезии либо способствуют росту, либо нет[109]. Управление ростом аксона на большом расстоянии включает в себя движение аксона вдоль градиента концентрации растворимого фактора.

Навигация конусов роста в спинном мозге

Хороший пример разнообразия механизмов и молекул, которые используют конусы роста для навигации к своим клеткам-мишеням, представляют аксоны комиссуральных интернейронов спинного мозга позвоночных В раннем периоде развития комиссуральные интернейроны, которые лежат в дорзальной части спинного мозга, «выпускают» аксоны, которые начинают расти в вентральном направлении, пересекая среднюю линию, и затем растут вдоль спинного мозга по направлению к своим синаптическим мишеням (рис. 23.24)[110].

Аксоны комиссуральных нейронов первоначально привлекаются к вентральной средней линии белком нетрин-1, растворимым хемоаттрактантом, образуемым специальными клетками базальной пластинки, лежащими вдоль средней линии спинного мозга (рис. 23.24А)[111]. Нетрин-1 взаимодействует с рецептором, экспрессируемым комиссуральными нейронами, называемым DCC (который

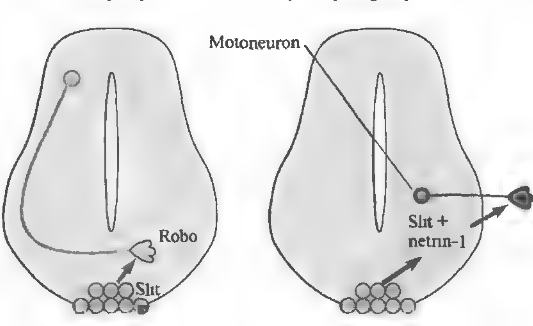


Рис. 23.24. Хемоаттракция на большой и короткой дистанции и хемоотталкивание направляют развивающийся аксон в спинном мозге позвоночных. (А) Нетрин-1, действующий как хемоаттрактант на большой дистанции, высвобождается клетками базальной пластинки и связывается со своим рецептором (DCC) на комиссуральных нейронах, чьи конусы роста он привлекает. (В) TAG-1, расположенный на конусах роста комиссуральных аксонов, связывается с NrCAM на клетках базальной пластинки. Такая хемоаттракция на короткой дистанции облегчает продвижение конусов роста комиссуральных аксонов вдоль базальной пластинки. (С) Robo, находящийся на конусах роста комиссуральных аксонов, связывается с белком slit на клетках базальной пластинки. Такая близкое хемоотталкивание предупреждает повторное пересечение аксонами базальной пластинки. (D) Slit и нетрин-1, высвобождаемые базальной пластинкой, взаимодействуют с рецепторами на конусах роста двигательных нейронов и отталкивают их. Такое отталкивание на больших расстояниях помогает направлять рост аксонов двигательных нейронов прочь от спинного мозга.

Fig. 23.24. Long- and Short-Range Chemoattraction and Chemorepulsion guide developing axons in the vertebrate spinal cord. (A) Netrin-1, acting as a long-range chemoattractant, is released by cells of the floor plate and binds to its receptor (DCC) on commissural neurons, attracting their growth cones. (B) TAG-1 on commissural Axon growth cones binds to NrCAM on floor plate cells. This short-range chemoattraction facilitates extension of commissural axon growth cones across the floor plate. (C) Robo on commissural axon growth cones binds to slit on floor plate cells. This short-range chemorepulsion prevents the axons from recrossing the floor plate. (D) Slit and netrin-1, released from the floor plate, interact with receptors on growth cones of motor neurons and repel them. This long-range chemorepulsion helps direct the growth of motor axons away from the cord.

уже упоминался ранее из-за своего взаимодействия с молекулами клеточной адгезии, см. рис. 23.20)[112]. Существование растворимого фактора, образующегося в базальной пластинке, который способен привлекать (attract) аксоны комиссуральных нейронов, было впервые показано при культивировании кусочков дорзальной части спинного мозга изолированно, либо вместе с кусочками базальной пластинки (рис. 23.25)[110]. Аксоны комиссуральных нейронов растут четко по направлению к базальной пластинке, даже если эксплантанты находятся друг от друга на расстоянии нескольких сотен микрон. Эта дистанция слишком велика для того, чтобы ее прошел филоподий конуса роста и требует растворимого фактора. Такой фактор, нетрин-1, входящий в семейство секреторных белков, характеризуется сходством доменов с N-концевыми доменами γ цепи ламинина-1 (рис. 23.25A)[111, 92]. Гомологи нетрина также играют роль в росте аксонов у дрозофилы и *C. elegans*.

Далее аксоны комиссурального нейрона пересекают вентральную среднюю линию, что они делают только однажды, таким образом оставаясь на контралатеральной стороне (рис. 23.24B, C). Это пересечение облегчается взаимодействиями между двумя адгезивными молекулами клеточной поверхности: TAG-1, которая экспрессируется на поверхности аксона спаечного нейрона, и NrCAM, экспрессируемого на клетках базальной пластинки[113, 114]. После пересечения средней линии экспрессия TAG-1 в аксонах ингибируется сигналами от клеток базальной пластинки, под действием которых в аксонах начинает синтезироваться протеин, называемый robo[115]. Robo представляет собой рецептор для другого белка, называемого slit, который высвобождается клетками базальной пластинки[116]. Взаимодействие между slit и

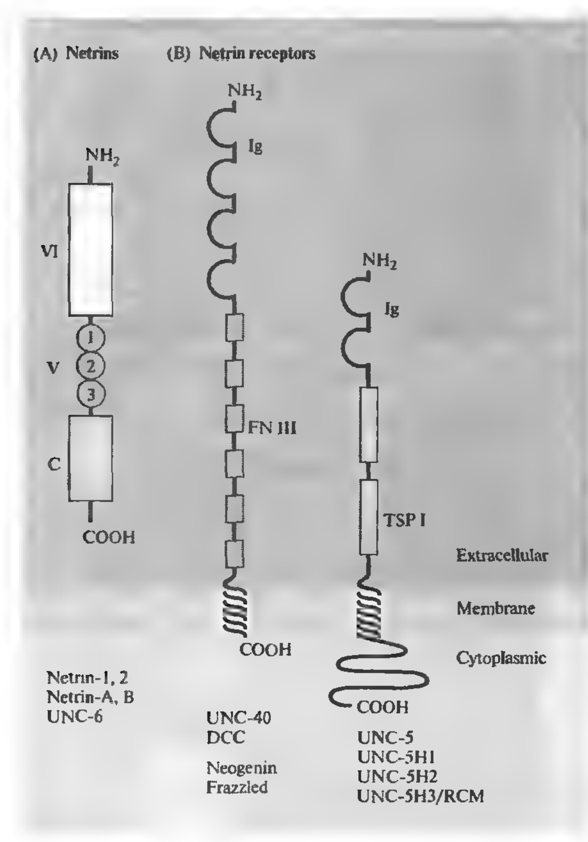


Рис. 23.25. Роль нетрина и его рецепторов в аттракции и отталкивании на большом расстоянии. (A) N-концевая аминокислотная часть секреторного белка нетрина состоит из доменов VI и V, которые гомологичны доменам аминокислотного конца γ цепи ламинина. Домен V содержит три ECG-повтора. С-концевой домен этой цепи не имеет гомологии с ламинином. (B) Рецепторы нетрина имеют внеклеточный домен, однократно пересекающий мембрану, и внутриклеточный домен. Внеклеточный домен семейства DCC рецепторов нетрина имеет четыре иммуноглобулиновых домена (Ig) и шесть повторов фибронектина III (FN III). DCC и их гомологи также могут играть роль молекул адгезии. Семейство рецепторов к нетрину UNC–5 имеет два иммуноглобулиновых домена и два домена, гомологичных тромбоспондину 1-го типа (TSP I), которые расположены внеклеточно, а также длинную цитоплазматическую последовательность. (C) Микрофотографии кусочков дорзального спинного мозга эмбрионов крысы (сверху на каждой из панелей), культивированных вместе с кусочками ткани базальной пластинки (слева), вместе с CDS клетками, секретирующими рекомбинантный нетрин-1 (в центре), и с контрольными COS клетками (справа). Нижняя пластинка и нетрин-1 оба способны вызывать значительный и направленный рост пучков комиссуральных аксонов из дорзальной области спинного мозга.

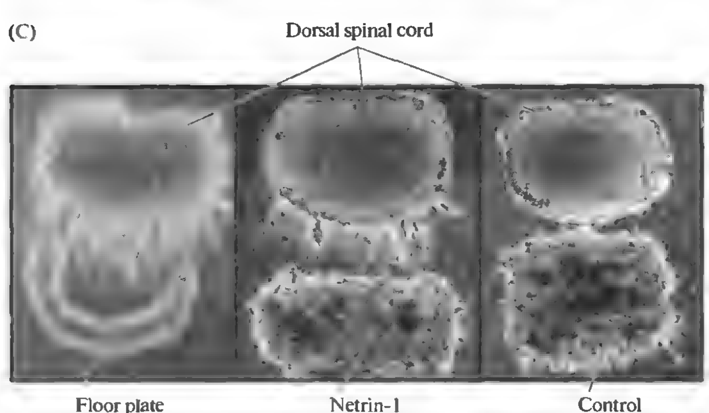


Fig. 23.25. Netrins and Netrin Receptors function in long-range attraction and repulsion. (A) The amino-terminal portion of the secreted protein netrin is made up of domains VI and V, which are homologous to domains at the amino terminus of the γ chain of laminin. Domain V contains three EGF-like repeats. The carboxy-terminal domain C has no homology to laminin. (B) Netrin receptors have an extracellular domain, a single membrane-spanning region, and an intracellular domain. The extracellular domain of the DCC family of netrin receptors has four immunoglobulin domains (Ig) and six fibronectin III repeats (FN III). DCC and its homologues also function as neural cell adhesion molecules. The UNC–5 family of netrin receptors has two immunoglobulin and two thrombospondin type I domains (TSP I) extracellularly, and a large cytoplasmic region. (C) Micrographs of pieces of dorsal spinal cord from embryonic rats (top in each panel) cultured with a piece of floor plate tissue (left), an aggregate of CDS cells secreting recombinant netrin-1 (middle), or control COS cells (right). The floor plate and netrin-1 both elicit the profuse and directed outgrowth of bundles of commissural axons from the dorsal spinal cord tissue. (After Tessier-Lavigne et al., 1988 and Kennedy et al., 1994; micrographs kindly provided by M. Tessier-Lavigne.)

robo отталкивает конусы роста комиссуральных интернейронов. Потеря аттракции к TAG-1–NrCAM контакту и приобретение коротко-дистантного отталкивающего взаимодействия slit–robo предупреждают возможное повторное пересечение аксоном средней линии.

Slit и нетрин-1 также диффундируют из базальной пластинки для отталкивания конусов роста мотонейронов. Такие отталкивающие взаимодействия направляют аксоны мотонейронов прочь от спинного мозга в направлении периферии (рис. 23.24D)[117, 118].

Семейство хеморепеллентов семафорины

Другими белками, которые играют роль хеморепеллентов, являются **семафорины**, большое семейство секреторных и трансмембран-

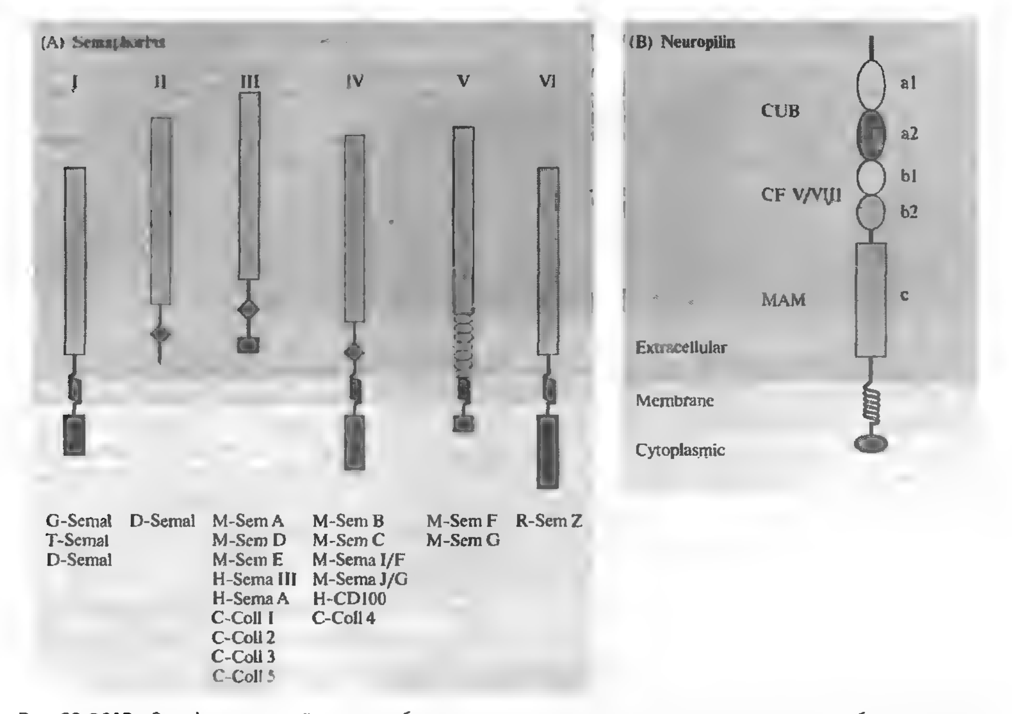


Рис. 23.26AB. Семафорины и нейропилин обеспечивают хемоаттракцию и хемоотталкивание на близких и дальних дистанциях. (A) Домен sema (полоски) характеризует все шесть классов семафоринов, которые включают секреторные (II и III) и связанные с мембраной (I, IV–VI) формы. Внеклеточные регионы также содержат домены, напоминающие иммуноглобулины (кружочки), повторы тромбосподина I типа (овалы), и домены, богатые щелочными аминокислотами (полоски). Цитоплазматические домены короткие и имеют большую вариабельность. (B) Нейропилин — рецептор семафорина. Во внеклеточном регионе домены a1 и a2 (также называемые CUB последовательностями) схожи с доменами комплементарных факторов C1a и C1s, протеином костного морфогенеза 1 и несколькими металлопротеиназами. Домены b1 и b2 повторяют домены факторов свертывания V и VIII. C-область содержит MAM домен, последовательности которого обнаружены в тирозинфосфатазе Mu, A5/нейропилине и металлоэндопептидазе меприне. Короткий цитоплазматический конец остается высококонсервативным от вида к виду.

Fig. 23.26AB. Semaphorins and Neuropilin mediate short- and long-range chemoattraction and chemorepulsion. (A) The sema domain (bars) characterizes all six classes of semaphorins, which include secreted (II and III) and membrane-bound (I, IV–VI) forms. Extracellular regions also contain immunoglobulin-like domains (diamonds), thrombospondin type I repeats (ovals), and domains rich in basic amino acids (bars). Cytoplasmic domains are short and highly variable. (B) Neuropilin is a semaphorin receptor. In the extracellular region, domains a1 and a2 (also called CUB motifs) are similar to domains in complement factors C1a and C1s, bone morphogenetic protein 1, and several metalloproteinases. The b1 and b2 domains resemble domains in coagulation factors V and VIII. The c region contains the MAM domain, a motif found in the tyrosine phophatase Mu, A5/neuropilin, and Meprin, a metalloendopeptidase. The short cytoplasmic tail is highly conserved across species.

(C) (D)

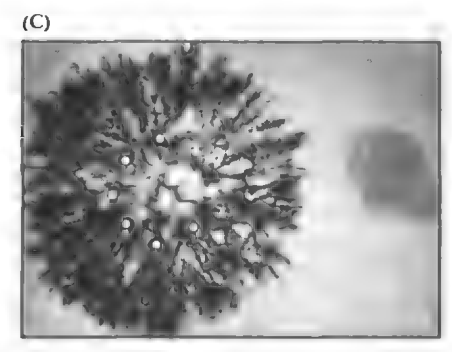
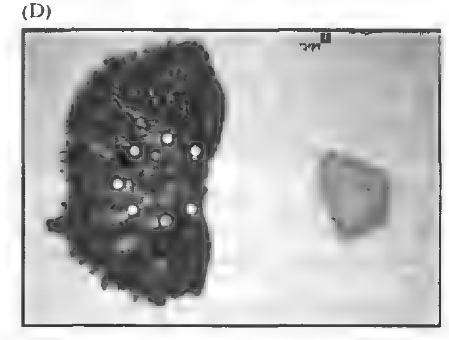



Рис. 23.26CD. (C и D) Семафорин III (Sema3A) — хеморепеллент дальней дистанции для сенсорных аксонов. Спинальный ганглий эмбриона крысы (слева на каждой панели) культивировали в течение 48 часов рядом с агрегатами COS клеток. Белыми кружками показаны контуры ганглия. Для того чтобы вызывать рост сенсорных волокон малого диаметра в среду был добавлен ФРН. (C) Контрольные COS клетки. Аксоны растут в виде венчика. (D) COS клетки, секретирующие рекомбинантный Sema3A. Sema3A отталкивает аксоны.

Fig. 23.26CD. (C and D) Semaphorin III (Sema3A) is a long-range chemorepellent for sensory axons. Embryonic rat dorsal root ganglia (left in each panel) were cultured for 48 h adjacent to aggregates of COS cells. White dots outline the ganglion. NGF was included in the culture medium to elicit outgrowth of small- diameter sensory fibers. (C) Control COS cells. Axons grow out in a radial fashion. (D) COS cells secreting recombinant Sema3A. Sema3A repels axons. (After Messersmith et al., 1995; micrographs kindly provided by M. Tessier-Lavigne.)

ных белков (рис. 23.26A)[119)]. Первоначально они были идентифицированы как факторы, управляющие ростом аксона у кузнечиков, и были признаны хеморепеллентами. Затем был обнаружен и выделен в чистом виде гомолог этого белка у позвоночных, коллапсин-1, который, как было показано, приводит к ретракции конусов роста в культуре клеток. Он также способен управлять на длинных дистанциях ростом аксона, вызывая его отклонения[120)]. Нейропилины являются высококонсервативным семейством рецепторов к семафоринам (рис. 23.26B)[121)].

Модуляция ответов на хеморепелленты и хемоаттрактанты

На пути передачи сигналов, которые обеспечивают ответы клетки на хемоаттрактанты и хеморепелленты, можно влиять при помощи кальций-зависимых протеинкиназ и протеинкиназ, зависящих от концентрации циклических нуклеотидов. Например, в культуре спинальных нейронов *Xenopus* активация пути циклических нуклеотидов более благоприятна для сигналов аттракции; ингибирование этих путей приводит к отталкиванию конуса роста[122)]. Таким образом, источник нетрина-1 притягивает конус роста культивированных спинальных нейронов *Xenopus*. Однако при добавлении ингибитора протеинкиназы А конусы роста поворачивали прочь от источника нетрина[123, 124)]. С другой стороны, конусы роста *Xenopus* в нормальных условиях направляются прочь от источника коллапсина-1; эти отталкивающие эффекты становятся привлекающими после активации сигнальных путей, связанных с цГМФ[125)]. В среде с низким содержанием кальция исчезают все типы ответов (как привлекающие, так и отталкивающие), а скорость роста возрастает.

§ 6. Иннервация клетки-мишени

Механизмы управления конусов роста, описанные до сих пор, направляют аксон к его конечной цели. Однако проблема того, как каждый аксон подходит к своей клетке-мишени, остается открытой. Путь, по которому ганглиозные клетки сетчатки иннервируют свои клетки-мишени в области передних бугров покрышки, является примером того, какие сигналы обеспечивают достижение правильного паттерна иннервации. Во время развития аксоны ганглиозных клеток задней или височной (temporal) части сетчатки направляются для иннервации в переднюю часть тектума,

Рис. 23.27. Роль отталкивающих взаимодействий в иннервации оптической области четверохолмия (тектума) цыпленка. (А) Ганглиозные клетки в назальной области сетчатки посылают сигналы к нейронам задней области четверохолмия; ганглиозные клетки темпоральной сетчатки — к передней области. Существует назотемпоральный градиент Eph A3 рецептора тирозинкиназы в ганглиозных клетках сетчатки и рострокаудальные градиенты лигандов Eph рецептора, эфрина-А2 и эфрина-А5 в области четверохолмия. Аксоны клеток височного ганглия избегают проникать в область заднего четверохолмия из-за репульсивных взаимодействий с рецепторами Eph и их лигандами. (В) В культуре клеток аксоны нейронов назальной сетчатки растут одинаково хорошо на пластинках, покрытых мембранами, выделенными из передней и задней области четверохолмия. (С) Аксоны нейронов темпоральной сетчатки предпочитают расти только на мембранах из передней области четверохолмия. (D) Аксоны темпоральной сетчатки растут одинаково хорошо как на интактных мембранах из передней области, так и на денатурированных мембранах задней области, что говорит о том, что обычно они отталкиваются чувствительными к нагреванию компонентами мембран из задней области тектума.

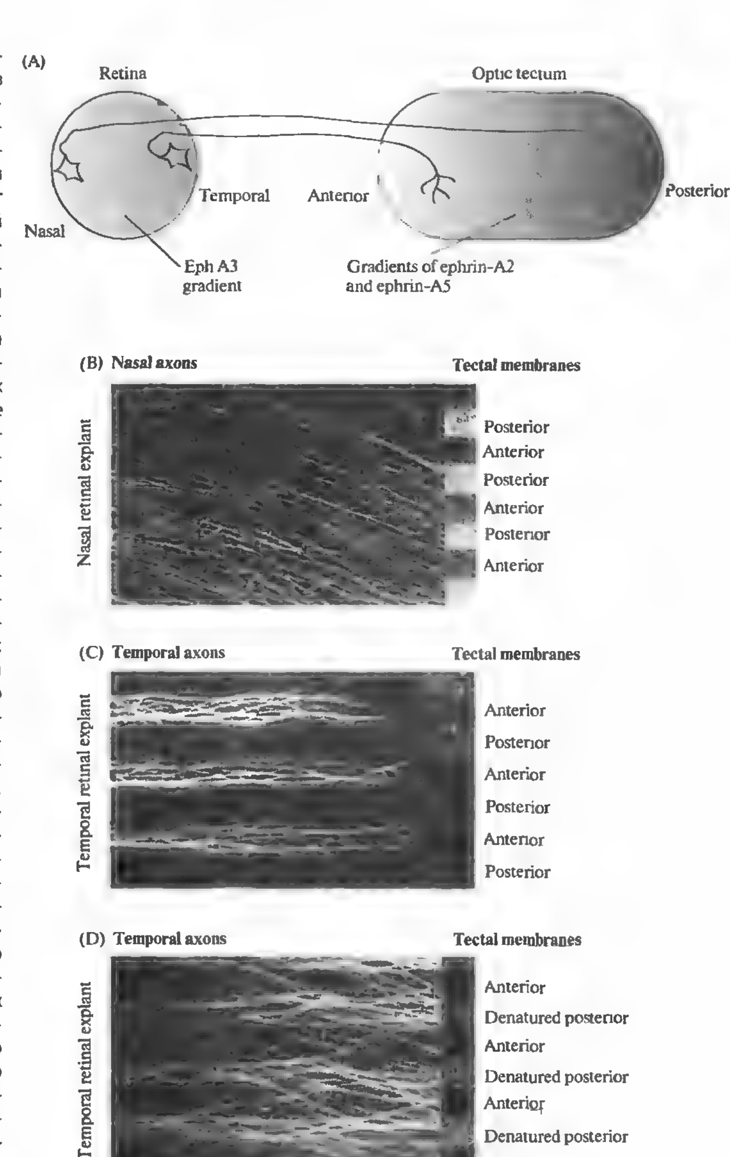


Fig. 23.27. The Role of Repulsive Interactions in Innervation of the optic tectum in the chick. (A) Ganglion cells in the nasal retina innervate neurons in the posterior tectum; ganglion cells in the temporal retina innervate neurons in the anterior tectum. There is a nasotemporal gradient of the Eph A3 receptor tyrosine kinase in retinal ganglion cells and anteroposterior gradients of the Eph receptor ligands ephrin-A2 and ephrin-A5 in the tectum. Axons of temporal ganglion cells are prevented from entering the posterior tectum by the repulsive interaction of Eph receptors and ligands. (B) In cell culture, axons from neurons in the nasal retina grow equally well on lanes coated with membranes isolated from anterior or posterior tectum. (C) Axons from neurons in the temporal retina prefer to grow on anterior membranes. (D) Axons from temporal retina grow equally well on intact anterior membranes and denatured posterior membranes, indicating that normally they are repelled by heat-sensitive components of the posterior membranes. (B and D from Walter, Henke-Fahle, and Bonhoeffer, 1987; C from Walter et al., 1987; micrographs kindly provided by F. Bonhoeffer.)

а клетки передней (nasal) части сетчатки направляются для иннервации задней части тектума (рис. 23.27).

В элегантной серии экспериментов Бонхоеффер с коллегами продемонстрировали, что аксоны определяют территории своей иннервации посредством отталкивающих взаимодействий, которые предотвращают вторжение аксонов височной зоны в область задней части тектума. Ганглиозные клетки височной сетчатки были помещены в культуру, где рядом с ними находились поверхности, покрытые мембранами, выделенными либо из передней, либо из задней области тектума. В этих условиях аксоны отталкивались мембранами из задней части тектума и росли преимущественно в направлении мембран своих естественных мишеней, мембран передней части тектума[126, 127]. Любопытно, что аксоны сетчатки, не имея подобного выбора, быстро растут в направлении любого субстрата, как из передней, так и из задней части тектума.

Молекулы, ответственные за такие отталкивающие взаимодействия, принадлежат к семейству рецепторов, связанных с тирозинкиназой (известных как Eph киназы), а также их лигандов (называемых эфринами, ephrines)[128, 129]. Эфрин-А2 и эфрин-5 экспрессируются в тектуме во время образования ретинотектальных связей, и их концентрация постепенно увеличивается в направлении спереди назад. Рецептор к Eph-A3 экспрессируется на аксонах клеток сетчатки соответственно назотемпоральному градиенту. При заключении в липидные пузырьки и добавлении в среду, омывающую аксоны клеток височной части сетчатки, эфрины А2 и А5 вызывают отделение конусов роста от субстратов и их ретракцию[130]. Эфрины и семейство Eph рецепторов, связанных с тирозинкиназой, действуют во всех частях развивающейся нервной системы, влияя на нахождение пути аксоном, миграцию клеток, образование связей между ними, в основном демонстрируя сходный отталкивающий механизм[131, 132].

Одного рострокаудального градиента недостаточно для того, чтобы аксоны клеток сетчатки правильно достигли своего окончательного месторасположения в тектуме[92, 133]. Более поздние изменения в рострокаудальных проекциях основываются как на определенно расположенных химических сигналах[134], так и на механизмах, зависящих от активности нейронов[135] (глава 25).

§ 7. Образование синапсов

Как только конус роста достигает своей мишени, он должен установить синаптический контакт, часто имеющий специфическое расположение на клетке-мишени. Анализ механизмов, благодаря которым формируются такие четкие связи в пределах ЦНС, является основной проблемой. Предпочтительным препаратом для изучения образования синаптических связей является нервно-мышечное соединение в скелетной мышце позвоночных.

Накопление рецепторов к ацетилхолину

Исследования Фишбаха, Кохена, Шанге, Салпетера, Штайнбаха, Пу, Кидокоро и других[136, 137] показали, что на ранних периодах развития рецепторы АХ распределены диффузно вдоль поверхности неиннервированных мышечных волокон с плотностью около нескольких сотен рецепторов на квадратный миллиметр. По мере того как конус роста мотонейрона приближается к мышечному волокну, в клетке-мишени возникают деполяризующие потенциалы в ответ на выделение АХ из конуса роста (рис. 23.28)[138]. После контакта частота спонтанного выделения квантов АХ быстро возрастает, как и величина синаптического потенциала, возникающего в ответ на стимуляцию аксона. Таким образом, в течение минут формируется функциональная синаптическая связь.

На первом этапе синаптической специализации происходит накопление рецепторов АХ (AChRs) непосредственно под терминалью аксона[137]. Этот процесс начинается через несколько часов после первоначального контакта. Через день-два плотность рецепторов под терминалью составляет несколько тысяч на квадратный миллиметр. Примерно в то же самое время в областях синапсов начинает накапливаться ацетилхолинэстераза и становятся заметны пучки матрикса пластинки в области синаптической щели. Дальнейшая дифференцировка нервно-мышечного соединения происходит постепенно, в течение нескольких последующих недель развития. У многих видов γ субъединица рецептора АХ заменяется на ε субъединицу, что приводит к формированию из эмбрионального рецептора рецептора взрослого типа (глава 3). Распределение рецепторов также меняется: концентрация под терминалью аксона постепенно увеличивается, достигая у взрослых уровня примерно 10^4

Рис. 23.28. Быстрое образование действующих синаптических связей между аксонами мотонейронов и мышечными клетками. (A, B) Фазово-контрастные фотографии растущих нервных отростков (N) и веретеновидных миоцитов (M) в нервно-мышечной культуре клеток *Xenopus* в начале (A) и в конце (B) электрической регистрации. (C, D) Whole-cell patch-clamp миоцитов. Можно зарегистрировать спонтанные синаптические токи уже через 1 минуту после контакта (C), которые увеличиваются на несколько порядков к 18-й минуте (D).

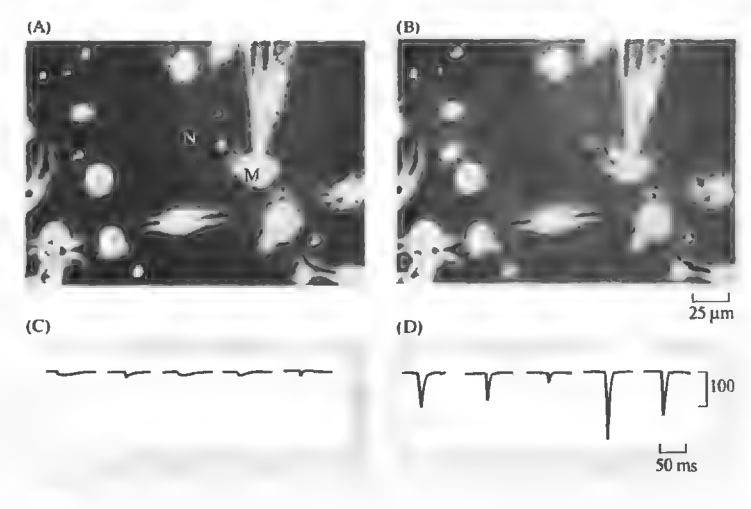


Fig. 23.28. Rapid Formation of Functional Synaptic Connections between motor axons and muscle cells. (A, B) Phase-contrast photographs of a growing neurite (N) and a spindle-shaped myocyte (M) in a *Xenopus* neuron–muscle cell culture at the beginning (A) and end (B) of electrical recording. (C, D) Whole-cell patch clamp records from the myocyte. Spontaneous synaptic currents can be recorded within 1 min of contact (C) and have increased in strength several-fold by 18 min (D). (From Evers et al., 1989.)

рецепторов на 1 мкм^2, а плотность рецепторов вне синаптической зоны мышечных волокон уменьшается до уровня меньше чем 10 рецепторов на 1 мкм^2. Метаболическая стабильность рецепторов АХ также меняется. До иннервации рецепторы мембраны имели период полужизни порядка 1 дня; рецепторы АХ в иннервированных волокнах удивительно стойкие, их период полужизни составляет около 10 дней. Изменения также происходят в терминали аксона, приводя в течение нескольких недель к образованию активных зон. Эти и многие другие исследования показывают, что образование синапса не является простым событием по принципу «все или ничего». Хотя функциональная синаптическая передача может устанавливаться довольно быстро, дифференцировка пре- и постсинаптических характерных свойств — более долгий процесс, идущий на протяжении нескольких недель развития, и он основан на обмене разнообразными молекулярными сигналами между нервной терминалью и мышечным волокном.

Детальные морфологические и физиологические эксперименты показывают, что конусы роста соприкасаются с поверхностью мышечной клетки в произвольном месте, игнорируя существующие кластеры рецепторов АХ, и быстро приводят к формированию новых агрегатов рецепторов (рис. 23.29)[139, 140].

Таким образом, терминали аксона должны высвобождать некий сигнал, который индуцирует накопление рецепторов АХ на мышечной клетке. Этот сигнал является специфическим для холинергических нейронов; при прорастании нехолинергических нейронов в мышечные клетки они не вызывают изменений в распределении рецепторов АХ. Однако сигналом к этому не является сам АХ; накопление рецепторов АХ под терминалями аксона происходит в культурах клеток в присутствии кураре и α-бунгаротоксина, которые блокируют взаимодействие АХ с его рецепторами. В экспериментах, изначально предназначенных для идентификации сигналов, контролирующих регенерацию нервно-мышечного соединения (глава 24), был идентифицирован белок, названный агрином, который высвобождался терминалями двигательного нерва и приводил к накоплению рецепторов АХ, холинэстеразы и других компонентов постсинаптического аппарата в синаптических областях[141].

Вызванная агрином синаптическая дифференцировка

Агрин существует в нескольких изоформах, которые возникают вследствие альтернативного сплайсинга одного гена[142]. Мотонейроны, мышечные клетки и шванновские клетки экспрессируют агрин, но только у мо-

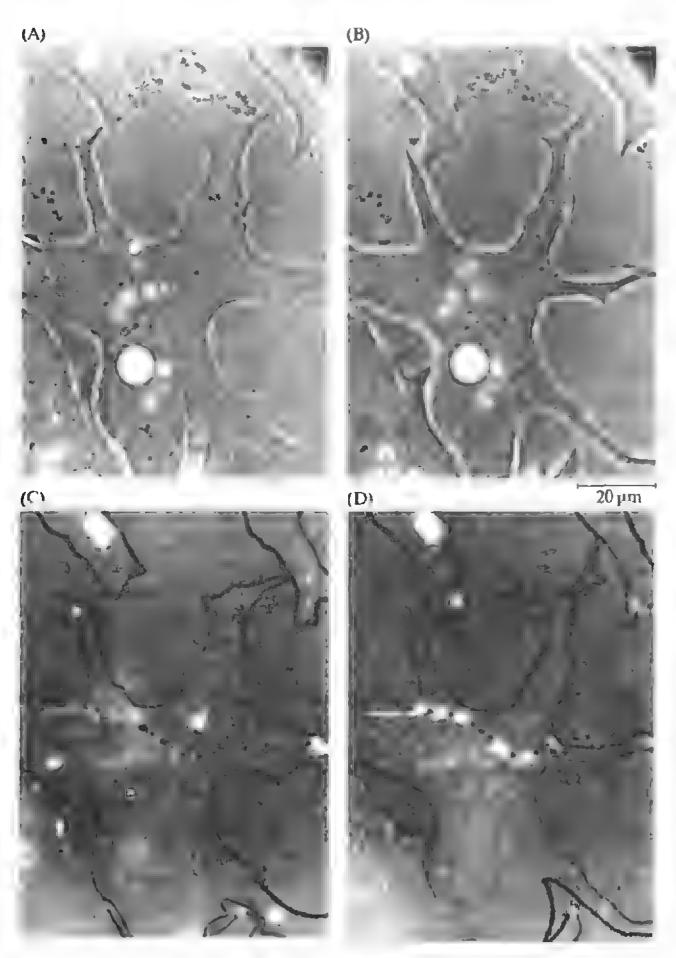


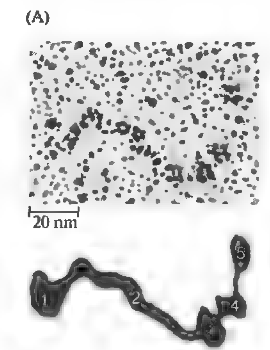
Рис. 23.29. Аксоны вызывают агрегацию рецепторов ацетилхолина в областях контакта с мышечными клетками. Фазово-контрастные (A, B) и флуоресцентные (C, D) микрофотографии нервно-мышечной культуры клеток *Xenopus*. Рецепторы ацетилхолина окрашены при помощи родамин α-бунгаротоксина. (A, C) До и сразу после контакта на миоците имеются спонтанно образованные кластеры рецепторов АХ. (B, D) Через 24 ч спонтанно образовавшиеся области рецепторов АХ исчезли и образовались новые области непосредственно в области аксонального контакта.

Fig. 23.29. Axons Induce Aggregation of Acetylcholine Receptors at sites of contact with muscle cells. Phase-contrast (A, B) and fluorescence (C, D) micrographs of a *Xenopus* neuron–muscle cell culture. Acetylcholine receptors are labeled with rhodamine α-bungarotoxin. (A, C) Before and immediately after contact there are spontaneous clusters of ACh receptors on the myocyte. (B, D) After 24 h, the spontaneous AChR patches have disappeared, and new patches have been induced to form beneath the axon. (From Anderson and Cohen, 1977; micrographs kindly provided by M. Cohen.)

тонейронов агрин находится в такой изоформе, которая способна вызывать постсинаптическую дифференцировку. Агрин является большой молекулой (heparan sulfate proteoglycan), домены которой взаимодействуют с ламинином, белками, связывающими гепарин, α-дистрогликаном, гепарином и интегринами (рис. 23.30)[143]. Способность индуцировать образование постсинаптической специализации в основном зависит от С-концевого домена.

Ведущая роль агрина в формировании нервно-мышечного соединения наиболее очевидна у мышей, у которых при помощи гомологичной рекомбинации выключена экспрессия гена агрина[144, 145]. При таком выключении гена мышечные волокна выглядят нормально и аксон растет в направлении развивающихся мышц, однако нервно-мышечные соединения не образуются. Подобный же фенотип наблюдается у мышей, у которых выключен синтез мышечно-специфического рецептора тирозинкиназы MuSK[146]. Это наводит на мысль, что MuSK формирует часть рецептора к агрину и что вызванное агрином аутофосфорилирование MuSK запускает внутриклеточный сигнальный каскад, который приводит к формированию необходимых компонентов в постсинапсе (рис. 23.31). Одним из наиболее важных компонентов является рапсин (rapsyn), белок, который, как считается, играет роль в передаче сигналов между рецепторами АХ, MuSK, α- и β-дистрогликанами и членами Src семейства цитоплазматических рецепторов тирозинкиназ[147]. Таким образом, в нервно-мышечном соединении мутантных мышей с дефицитом рапсина происходит накопление MuSK и выборочная экс-

Рис. 23.30. Агрин представляет собой гепаран-сульфат протеогликана большой массы (400–600 кДа). Его домены взаимодействуют с ламинином, гепаран-сульфат протеогликанами (HSPGs), гепарином, α-дистрогликаном, интегрином, гепарин-связывающими белками и рецепторами агрина, которые вызывают агрегацию рецепторов АХ. (А) Электронная микрофотография агрина после rotatory shadowing*). (В) Схематическая диаграмма структурных и связывающихся доменов агрина цыпленка. EG — домен, подобный эпидермальному фактору роста; FS — домен, подобный фолиостатину; LE — домен, подобный ламинину EGF; LG — домен, подобный ламинину G; SEA — последовательность, обнаруженная в белках спермы морского ежа, энтерокиназах и агрине; S/T — домены, богатые серином и/или треонином. Также показаны области связывания. Глобулярные (1, 3–5) и вытянутые (2) области молекулы можно увидеть в части А.



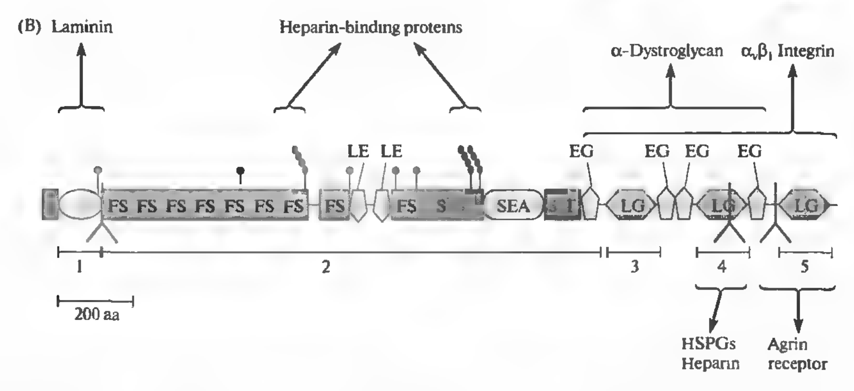


Fig. 23.30. Agrin Is a Large Heparan Sulfate Proteoglycan (400 to 600 kDa) with domains that interact with laminin, heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), heparin, α-dystroglycan, integrin, heparin-binding proteins, and the agrin receptor that causes AChR aggregation. (A) Electron micrographs of agrin after rotary shadowing. (B) Schematic diagram of the structural and binding domains of chick agrin. EG = epidermal growth factor-like domain; FS = follistatin-like domain; LE = laminin EGF-like domain; LG = laminin G-like domain; SEA = motif found in sea urchin sperm protein, enterokinase, and agrin; S/T = serine and/or threonine-rich domain. Binding regions are indicated, as are globular (1, 3–5) and extended (2) regions of the molecule that can be recognized in part A. (After Denzer et al., 1998; micrograph kindly provided by M. Rueg.)

прессия гена рецептора АХ в ядре, а также формируются некоторые характерные для синапса свойства, однако не происходит накопления рецепторов АХ.

Среди белков, которые накапливаются в ответ на изменения в синапсе под действием агрина, находится ARIA, член семейства белков нейрегулинов (neuregulin) и белки рецепторов нейрегулинов erbB2, erbB3 и erbB4[148]. Активация erbB рецепторов в мышце приводит к экспрессии синаптических субъединиц рецептора АХ.

Гораздо меньше известно о дифференцировке пресинаптической нервной терминали. Эксперименты МакМахана показали, что молекулы, прочно связанные с синаптической базальной мембраной во взрослой мышце, могут вызывать формирование активных зон в регенерирующих аксонах[141]. Отсутствие пресинаптической специализации у мутантных мышей с дефицитом агрина и MuSK может говорить о том, что во время развития пресинаптическая дифференцировка управляется ретроградными сигналами с мышечных клеток в ответ на выделение агрина[145]. Одним из таких ретроградных сигналов, связанных с базальной пластинкой, является ламинин-β2; он накапливается во время изменений в постсинапсе в ответ на агрин[149], и у мутантных мышей, у которых имеется дефицит ламинина-β2, имеются явные аномалии пресинаптической дифференцировки[150].

---

*) Rotary shadowing — техника, разработанная в 1983 году Бакуолтером и Розенбергом для электронного микроскопирования высокомолекулярных белков. — *Прим. перев.*

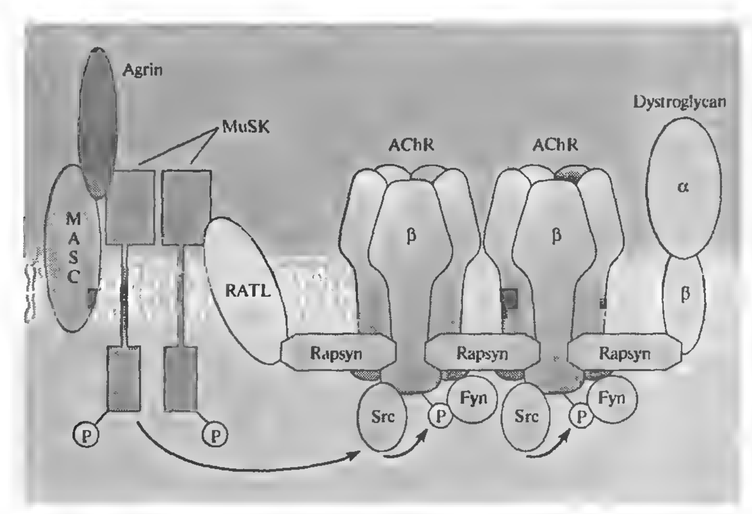


Рис. 23.31. Взаимодействие агрина с MuSK запускает дифференцировку постсинаптических образований в мышечной клетке, где начинают накапливаться рецепторы АХ, рапсин и дистрогликаны. Связывание агрина с MuSK требует корецептора неидентифицированного типа (MASK) и приводит к аутофосфорилированию тирозина MuSK и активации внутриклеточных киназ Src и Fyn. Активированный MuSK захватывает рапсин посредством неидентифицированного трансмембранного белка, RATL. Рапсин, в свою очередь, захватывает дистрогликан и рецепторы АХ, которые фосфорилируются по остаткам тирозина в β-субъединице. Через взаимодействие с дистрогликаном происходит накопление большого количества дополнительных синаптических факторов (не показано).

Fig. 23.31. Interaction of Agrin with MuSK triggers differentiation of postsynaptic specializations in muscle cells at which ACh receptors, rapsyn, and dystroglycan accumulate. Binding of agrin to MuSK requires an unidentified coreceptor (MASC) and results in tyrosine autophosphorylation of MuSK and activation of intracellular tyrosine kinases Src and Fyn. Activated MuSK recruits rapsyn, via an unidentified transmembrane protein, RATL. Rapsyn, in turn, recruits ACh receptors, which become phosphorylated on tyrosine residues of the β subunit, and dystroglycan. Many additional postsynaptic components accumulate through interactions with dystroglycan (not shown).

Образование синапсов в ЦНС

Что происходит во время формирования синапсов в ЦНС, где несколько пресинаптических клеток, которые выделяют ГАМК, глутамат, АХ и серотонин могут конвергировать на один постсинаптический нейрон? Приводит ли каждая из терминалей к накоплению определенных рецепторов, или терминали ищут уже существующие кластеры своих рецепторов, или постсинаптические зоны уже содержат смесь рецепторов для разных трансмиттеров? Исследования Банкера, Шенга, Крейга и их коллег на культуре нейронов гиппокампа показывают, что рецепторы к глутамату концентрируются под терминалями глутаматергических нейронов в области синаптических шипиков, а рецепторы ГАМК концентрируются под терминалями ГАМК-ергических аксонов в области стволов дендритов (рис. 23.32)[151]. Клетки, развивающиеся в культуре, спонтанно образуют кластеры рецепторов, однако эти кластеры игнорируются терминалями аксона. Вместо этого аксоны индуцируют образование *de novo* постсинаптической структуры белков цитоскелета, к которым затем присоединяются соответствующие рецепторы[152].

В препарате сетчатки млекопитающих также возможно изучить локализацию рецепторов и образование синапсов. У взрослых животных $GABA_A$, $GABA_C$ и рецепторы глицина локализуются на постсинаптической мембране в виде кластеров, расположенных в различных синаптических зонах[153]. Более того, отдельная ганглиозная клетка экспрессирует несколько изоформ α-субъединицы $GABA_A$ рецептора, которые обнаруживаются в различных образованных ею синапсах[154]. Таким образом, субъединицы рецепторов ГАМК и глицина селективно собираются в многомерные рецепторы, которые, в свою очередь, направляются в различные типы синапсов. Во время развития нейроны сетчатки сначала окрашиваются на рецепторы к глицину и ГАМК диффузно; когда начинается формирование морфологически идентифицируемых синапсов, рецепторы начинают образовывать агрегаты[153, 155].

Рис. 23.32. (См. цветную вклейку после с. 640.) Избирательное накопление постсинаптических рецепторов в синапсах между нейронами гипокампа крысы, выращенными в культуре. Флуоресцентные микрофотографии пирамидных клеток, которые получают два типа синаптических сигналов: возбуждающие синапсы, в которых трансмиттером служит глутамат, и тормозные синапсы, где трансмиттером является ГАМК. В первой колонке визуализованы постсинаптические рецепторы, во-второй — пресинаптические терминали, и в третьей эти рисунки объединены. (A) АМРА-рецепторы глутамата окрашены при помощи антител к GluR1 субъединице (GluR). Все синаптические терминали окрашены при помощи антител к синаптофизину (Syn). Рецепторы глутамата образуют кластеры непосредственно под субпопуляцией нервных терминалей (более светлые регионы на объединенных рисунках). (B) ГАМК$_A$ рецепторы окрашены при помощи антител к $\beta 2/3$ субъединицам (GABA$_A$R). Нервные терминали, выделяющие ГАМК, окрашены при помощи антител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD). Рецепторы ГАМК$_A$ образуют кластеры напротив ГАМК-ергических терминалей (более светлые области на объединенных рисунках). (C) АМРА рецепторы глутамата окрашены при помощи антител к GluR1 субъединице (GluR), нервные терминали, выделяющие ГАМК, окрашены при помощи антител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD). Кластеры рецепторов глутамата не локализуются в области ГАМК-ергических терминалей. Таким образом, рецепторы глутамата образуют кластеры избирательно под терминалями, секретирующими глутамат, а ГАМК$_A$ рецепторы образуют кластеры исключительно под терминалями, выделяющими ГАМК.

Fig. 23.32. Selective Accumulation of Postsynaptic Receptors at synapses between rat hippocampal neurons grown in cell culture. Fluorescence micrographs of pyramidal cells, which receive two types of synaptic input: excitatory synapses, at which glutamate is the transmitter, and inhibitory synapses, at which GABA is the transmitter. In the first column, postsynaptic receptors are visualized, in the second, presynaptic terminals, and in the third, the images are merged. (A) Glutamate AMPA receptors are labeled with antibodies to the GluR1 subunit (GluR), all synaptic terminals are labeled with antibodies to synaptophysin (Syn). Glutamate receptors cluster beneath a subpopulation of nerve terminals (more light in merged images). (B) GABA$_A$ receptors are labeled with antibodies to the $\beta 2/3$ subunit (GABA$_A$R), nerve terminals releasing GABA are labeled with antibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD). GABA$_A$ receptors cluster opposite GABAergic terminals (more light in merged images). (C) Glutamate AMPA receptors are labeled with antibodies to the GluR1 subunit (GluR), nerve terminals releasing GABA are labeled with antibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD). Glutamate receptor clusters do not colocalize with GABAergic nerve terminals. Thus, glutamate receptors cluster specifically beneath terminals releasing glutamate, and GABA$_A$ receptors cluster selectively beneath terminals releasing GABA. (Micrographs kindly provided by A. M. Craig.)

§ 8. Факторы роста и выживание нейронов

Фактор роста нерва (nerve growth factor)

Развивающиеся нейроны для своего выживания нуждаются в определенных белках, называемых факторами роста. Первым из факторов роста был идентифицирован фактор роста нерва (ФРН, NGF). В своих пионерских работах Леви-Монтальчини, Кохен с коллегами первыми показали, что ФРН стимулирует рост отростков сенсорных и симпатических нейронов. Позднее они показали, что ФРН необходим также для выживания нейронов. Блокирование действия ФРН у новорожденных мышат при помощи антител вело к гибели симпатических нейронов. При этом парасимпатическая система не поражалась, и спинномозговые ганглии были только немного меньше, чем в норме. В последующих экспериментах было показано, что на более ранней стадии развития ганглию также необходим ФРН для выживания и эти нейроны не выживали, если антитела вводились до рождения (путем иммунизации матери)[156]. У взрослых животных антитела к ФРН были гораздо менее эффективны в обоих популяциях клеток. Нуль-мутации ФРН и его высокоаффинного рецептора (что обсуждается ниже в этой главе) у трансгенных мышей также подтверждают, что симпатическим и сенсорным нейронам необходим ФРН для выживания[157, 158]. Таким образом, как симпатические, так и сенсорные нейроны имеют критический период своего развития, выживание в который зависит от наличия ФРН.

Захват и ретроградный транспорт ФРН

То, что от ФРН зависит выживание нейрона, говорит о том, что его действие происходит в теле клетки. Симпатические нейроны выращивают в специальных камерах, состоящих из трех отсеков (рис. 23.33). В центральном отсеке, куда помещаются нейроны, должен находиться ФРН, иначе нейроны гибнут[159]. Однако, как только отростки нейрона достигают боковых отсеков камеры, ФРН может быть удален из центрального отсека и клетки остаются живыми, при условии, что в боковых отсеках ФРН остается (рис. 23.33B). Это дает основания полагать, что трофические эффекты ФРН на развивающиеся нейроны могут

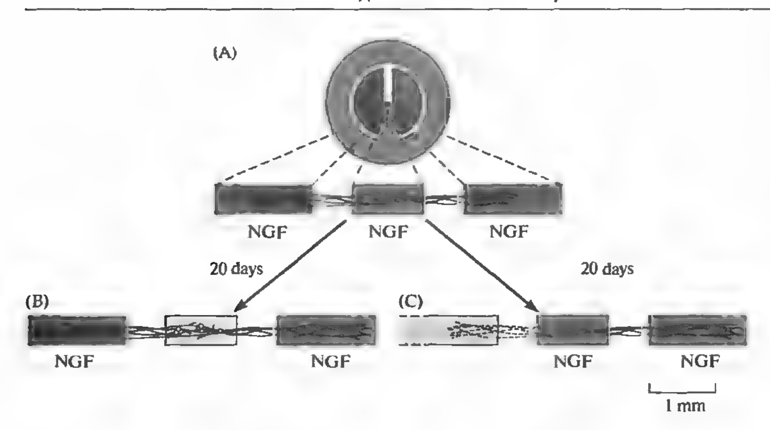


Рис. 23.33. Фактор роста нерва и выживание веточек аксонов клеток симпатических ганглиев, растущих в культуре клеток. (А) Нейроны, полученные из неонатального симпатического ганглия и помещенные в центральную секцию, посылают свои отростки под тефлоновым разделителем и в соседние секции; все секции содержат ФРН. (В) После начального роста отростков удаление ФРН из центральной секции в течение 20 дней не приводит ни к какому эффекту; нейроны в центральной секции используют ФРН, который ретроградно транспортируется из их терминалей, расположенных в боковых секциях. (С) После начального роста отростков удаление ФРН из левой секции вызывает дегенерацию нервных отростков в этой области, а те, которые находились в секции, содержащей ФРН, остаются интактными (Из Campenot, 1982.)

Fig. 23.33. Nerve Growth Factor and the Survival of Axon Branches from sympathetic ganglion cells grown in cell culture. (A) Neurons dissociated from neonatal sympathetic ganglia plated in the central compartment send neurites under a Teflon divider and into the adjacent compartments; all compartments contain NGF. (B) After initial outgrowth has occurred, removal of NGF from the central compartment for 20 days has no effect; neurons in the central compartment are maintained by NGF transported retrogradely from their terminals in the side compartments. (C) After initial outgrowth has occurred, removal of NGF from the left compartment causes the neurites entering it to degenerate, while those in the compartment containing NGF remain. (After Campenot, 1982.)

передаваться в виде ретроградного транспорта ФРН от нервных терминалей в тела клеток.

Исследования, проведенные на взрослых животных с радиоактивно меченым ФРН, показали, что он активно захватывается в нервные терминали и активно транспортируется ретроградно в сому[160]. Взрослым нейронам ФРН не нужен для выживания, однако он регулирует, среди всего прочего, синтез адреналина, индуцируя образование двух ферментов, необходимых для его синтеза: тирозингидроксилазу и дофамин β-гидроксилазу[161]. При повреждении транспорта ФРН взрослого нейрона уровень этих ферментов падает.

Факторы роста семейства нейротрофинов

Наблюдения, описанные в предыдущем разделе, привели к анализу молекулярных механизмов действия факторов роста большим количеством исследовательских групп, включая группы Леви-Монтальчини, Шутера, Тоенена и Барде[168]. Они изучали такие вопросы, как свойства ФРН, рецепторов на мембране, которые связываются с ФРН, и последующие метаболические события. В слюнной железе ФРН присутствует в виде комплекса, состоящего из трех субъединиц: α, β и γ. Ответственной за выживание нейрона и его рост является β-субъединица; она состоит их двух одинаковых белковых цепей, каждая из которых содержит 118 аминокислот и 3 дисульфидных мостика.

Сенсорные нейроны не только иннервируют свои мишени на периферии, но также направляют свои аксоны в ЦНС. Естественным является вопрос: существуют ли факторы, подобные ФРН, в ЦНС? В самом деле, в экстракте из ЦНС был обнаружен протеин, названный мозговым нейротрофическим фактором (МНФ, brain-derived neurotrophic factor, BDNF), который способствует выживанию нейронов дорзального спинного ганглия (ДСГ) в культуре и спасает их от гибели, если вводится *in vivo* эмбрионам во время периодов естественной гибели нейронов[169]. Очистка и описание свойств МНФ выявили, что он имеет высокую степень гомологии с ФРН, показывая, что ФРН и МНФ являются членами одного семейства ростовых факторов, которое было названо **нейротрофинами**. Молекулярно-генетические эксперименты помогли выявить еще несколько нейротрофинов: NT-3, NT-4/5 и NT-6[170]. Все они состоят из димеров небольших основных белков, соединенных друг с другом при помощи бисульфидных связей между остатками цистеина. Димеры выгля-

дят как симметричные белки с различными основными регионами, которые определяют свойства рецептора при встраивании его в мембрану (рис. 23.34)[171].

На ранних периодах развития, до того, как произойдет иннервация периферических мишеней сенсорными нейронами, клеткам нервного гребня и сенсорным нейронам в ДСГ и ганглии тройничного нерва необходимы МНФ и NT-3 для пролиферации, дифференцировки и выживания[172]. На таких ранних стадиях нейротрофины, по-видимому, секретируются самими нейронами, либо мезенхимальными тканями, расположенными вдоль роста аксонов сенсорных нейронов[173]. В более поздние периоды, после того, как аксоны достигают своих целей, сенсорные нейроны начинают экспрессировать рецепторы к ФРН и становятся зависимыми от ФРН, секретируемого их мишенями[174].

Нейротрофины в ЦНС

Особенный интерес представляет нахождение популяции клеток, чувствительной к ФРН, в ЦНС[175]. Таковыми являются холинергические нейроны, которые расположены в базальной области переднего мозга и которые иннервируют несколько различных структур, в том числе гиппокамп — область ЦНС, которая, как считают, связана с процессами памяти и обучения (главы 12 и 14). Если аксоны этих нейронов у взрослой крысы перерезать, то клетки погибают. Однако, если после перерезания вводить в ЦНС ФРН, то клетки выживают после аксотомии. Число этих клеток, которые окрашиваются маркерами холинергических нейронов, уменьшается с возрастом, вместе со способностью крыс запоминать лабиринт и выполнять другие пространственные задачи[176]. Если ФРН вводится взрослым крысам, число клеток, которые окрашиваются, увеличивается и улучшается выполнение крысами пространственных задач[177]. Эти наблюдения показывают, что выживание и рост нейронов в ЦНС, скорее всего, зависит от факторов, которые одинаковы или близки к тем, которые были идентифицированы для периферических нейронов. Полученные результаты позволяют предполагать, в терминах молекулярной биологии, возможные дефекты этих факторов, которые могут привести к нарушениям развития мозга, и возможные пути борьбы с этими дефектами[178].

МНФ и NT-3 широко распространены в ЦНС как во время развития, так и у взрослых. Клетки коры и гиппокампа, скорее всего, нуждаются в МНФ и NT-3 для выживания, хотя изменения в выживаемости клеток в ЦНС трудно проследить[179]. МНФ, как было показано, влияет на рост и сложность ветвления аксонов и дендритов в развивающейся ЦНС[180]. Анализ мышей с генетическим дефицитом представляет многообещающий подход к пониманию роли нейротрофинов в развивающейся нервной системе[181].

Нейротрофины также могут играть определенную роль и в ЦНС взрослых животных[180]. Физиологическая активность вызывает экспрессию определенных нейротрофинов в разных областях ЦНС и в ответ на различные стимулы. В свою очередь, нейротрофины, как было показано, способны влиять на физиологическую активность, облегчая синаптическую передачу и увеличивая или уменьшая возбудимость нейронов посредством регуляции экспрессии ионных каналов.

Рецепторы к нейротрофинам

Нейротрофины взаимодействуют с двумя типами рецепторов на поверхности нейронов-мишеней (см. рис. 23.34)[182, 183]. Все нейротрофины связываются с относительно одинаковой и низкой активностью ($K_d = 10^{-9}$ М) с мембранным рецептором, который был первоначально описан как низкоаффинный быстрый рецептор ФРН, или $p75^{NGFR}$; более правильно называть этот рецептор низкоаффинным рецептором к нейротрофинам, или $p75^{LNTR}$. Этот рецептор экспрессируется как в нейрональных, так и в ненейрональных клетках. Также существуют высокоаффинные ($K_d = 10^{-11}$ М) рецепторы к нейротрофинам. Результаты биологических проб показывают, что эффекты нейротрофинов на выживание клеток и на рост отростков нервов обусловливаются высокоаффинными рецепторами.

Хотя высокоаффинные рецепторы к ФРН обычно расположены только на нейронах, они были первоначально обнаружены в клетках карциномы толстой кишки человека, как часть продукта синтеза онкогена *trk* (онкогенами называют гены, которые управляют трансформацией клеток). Аналог онкогена *trk*, находящийся в нормальных клетках, кодирует белок с массой около 140 кДа, называемый $p140^{prototrk}$ или просто Trk. Структура белка Trk, предсказанная на основе его аминокислотной последовательности, состоит из внеклеточного домена, содержащего сайт

Рис. 23.34. (См. цветную вклейку после с. 640.) Высоко- и низкоаффинные рецепторы нейротрофинов. Димер нейротрофина связывается с двумя высокоаффиными Trk рецепторами при помощи консервативных областей нейротрофинов, которые взаимодействуют со всеми типами Trk рецепторов и уникальными регионами, специфичными для определенного Trk рецептора. Регионы, которые сохраняются у всех нейротрофинов, участвуют в связывании димера нейротрофина с двумя низкоаффинными $p75^{NGFR}$ молекулам.

Fig. 23.34. High- and Low-Affinity Neorotrophin Receptors. The neurotrophin dimer (NGF is shown) binds to two high-affinity Trk receptors through conserved regions of the neurotrophins that interact with all Trk receptors and unique regions specific for a particular Trk receptor. Regions that are conserved in all neurotrophins mediate binding of the neurotrophin dimer to two low-affinity $p75^{NGFR}$ molecules. (After Wiesmann et al., 1999.)

связывания нейротрофина, короткий трансмембранный сегмент, а также внутриклеточный домен, кодирующий тирозинкиназу (рис. 23.34). Существуют по крайней мере три члена семейства про-онкогенов *trk*, каждый из которых является высокоаффинным рецептором для одного или нескольких нейротрофинов: TrkA — рецептор к ФРН и NT-6; TrkB, по видимому, является рецептором к МНФ и NT-4/5, а TrkC является рецептором к NT-3 (см. табл. 23.2).

Связывание нейротрофинов с высокоактивными рецепторами приводит в первую очередь к увеличению фосфорилирования тирозина рецепторами. Это происходит вследствие аутофосфорилирования; вызванное лигандом образование рецепторного димера способствует приближению друг к другу внутриклеточных доменов тирозинкиназы каждого рецептора таким образом, что они фосфорилируют друг друга. Фосфорилирование рецептора Trk активирует четыре внутриклеточных сигнальных пути: фосфорилирование тирозина белка, названного SNT (*suc*-associated neurotrophic factor–induced tyrosine-phosphorylated target, связанная с *suc* и тирозин-фосфорилируемая в ответ на нейтрофические факторы мишень), фосфолипазу С, фосфоинозитол-3-киназу и каскад Ras-MAP киназы (рис. 23.35)[184].

Таблица 23.2. Нейротрофины и рецепторы нейротрофинов.

Table 23.2. Neurotrophins and neurotrophin receptors.

Neurotrophin	High-affinity receptor	Low-affinity receptor
NGF	TrkA	$p75^{LNTR\,a}$
BDNF	TrkB	$p75^{LNTR}$
NT-3	$TrkC^{b}$	$p75^{LNTR}$
NT-4/5	TrkB	$p75^{LNTR}$
NT-6	TrkA	$p75^{LNTR}$

[a] Originally termed $p75^{NGFR}$.
[b] NT-3 also binds TrkB and TrkA, but with lower affinity.

Функция низкоаффинного рецептора, который не имеет внутриклеточных доменов, неизвестна. В некоторых клетках он может взаимодействовать с высокоаффинным рецептором во время связывания нейротрофинов. В других клетках, особенно в тех, в которых нет высокоаффинных рецепторов, он может управлять гибелью клеток[185] или обеспечивать механизм ограниченной диффузии для установления высокой локальной концентрации нейтротрофинов, что необходимо для регенерации периферического нерва (глава 24).

§ 9. Конкурентные взаимодействия во время развития

После того как аксон достигает своих мишеней и образует синаптические связи, два процесса управляют паттерном иннервации. Одним является период гибели клеток, когда большое количество нейронов, которые установили синаптические связи, погибает. Вторым является уменьшение количества аксонов и синапсов, что сопровождается реорганизацией оставшихся связей, формирующих взрослый паттерн иннервации. Каждый из этих процессов регулируется конкуренцией за ограниченное количество факторов роста.

Гибель нейронов

Удивительной особенностью развития нервной системы является то, что многим ее нейронам суждено погибнуть во время развития. У беспозвоночных интенсивная гибель нейронов сопровождается стремительными изменениями, происходящими во время метаморфоза, и регулируется гормонами[186]. Однако в развивающейся ЦНС как позвоночных, так и беспозвоночных гибель клеток происходит также и в отсутствие значительных морфологических изменений[187].

Эксперименты, выполненные Гамбургером и Леви-Монтальчини, впервые выявили

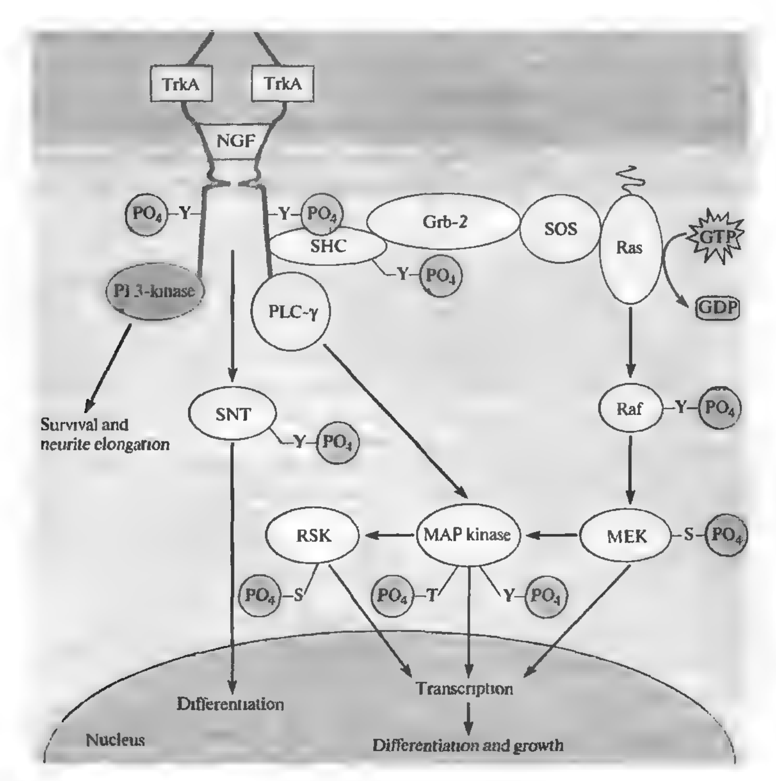


Рис. 23.35. Связывание димера фактора роста нервов с двумя TrkA рецепторами приводит к тому, что домен внутриклеточного белка тирозинкиназы каждого из TrkA рецепторов фосфорилирует остатки тирозина другого TrkA рецептора. Это запускает четыре внутриклеточных сигнальных каскада, которые приводят к росту и дифференцировке. Активация фосфоинозитол-3-киназы (PI 3-kinase) способствует удлинению отростков и их выживанию. Фосфорилирование тирозина SNT приводит к дифференцировке. Активация фосфолипазы C-γ (PLC-γ) стимулирует MAP киназы, которые индуцируют экспрессию генов, дифференцировку и рост как непосредственно, так и через фосфорилирование RSK. MAP киназа также активируется через сигнальный каскад, который включает связывание белков SHC, Grb-2, SOS и Ras, а также киназ Raf и MEK. —S—PO_4 — фосфорилирование серина; —T—PO_4 — фосфорилирование треонина; —Y—PO_4 — фосфорилирование тирозина.

Fig. 23.35. Binding of the Nerve Growth Factor Dimer to two TrkA receptors brings each TrkA receptor's intracellular protein tyrosine kinase domain into position to phosphorylate tyrosine residues on the other TrkA receptor. This triggers four intracellular signaling cascades, which lead to growth and differentiation. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) promotes survival and neurite elongation. Tyrosine phosphorylation of SNT promotes differentiation. Activation of phospholipase C-γ (PLC-γ) stimulates MAP kinase, which induces gene expression, differentiation, and growth, both directly and by phosphorylating RSK. MAP kinase is also stimulated through a signaling cascade that involves the coupling proteins SHC, Grb-2, SOS, and Ras, and the kinases Raf and MEK. —S—PO_4 = serine phosphorylation; —T—PO_4 = threonine phosphorylation; —Y—PO_4 = tyrosine phosphorylation.

запрограммированную гибель нейронов эмбрионов позвоночных, а также показали, что степень гибели клеток может зависеть от размеров ткани-мишени[60, 188]. Они показали, например, что в развивающейся конечности в то время, когда формируются первые синаптические связи с миофибриллами, от 40 до 70 % мотонейронов, которые послали аксоны в эту конечность, погибают. Имплантация дополнительной конечности уменьшает долю погибающих мотонейронов, а удаление одного из зачатков конечностей приводит к увеличению числа гибнущих клеток, что дает основания для предположения, что мотонейроны конкурируют за некие трофические вещества, выделяемые тканью-мишенью.

В самом деле, большое разнообразие нейротрофических белков, в основном вырабаты-

ваемых в мышце, как было обнаружено, могут управлять развитием мотонейронов: МНФ, NT-3 и NT-4/5, ИФР (инсулиноподобный фактор роста, IGF, insulin-like growth factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor, нейротрофический фактор ресничек), GDNF (glial-derived neurotrophic factor, глиальный нейротрофический фактор), CDF (cholinergic differentiation factor, фактор холинергической дифференцировки, также называемый LIF, leukemia inhibitory factor, фактор подавляющий лейкемию) и ИФР-1 (инсулиноподобный фактор роста 1)[189)–192)]. При введении их эмбриону эти белки предупреждают гибель мотонейронов, которые без этих факторов неминуемо погибли бы. Однако существует и несколько доказательств, включая анализ мутантных мышей, у которых отсутствует один или несколько подобных белков или их рецепторов, которые показывают, что ни один из этих факторов не является необходимым для выживания мотонейрона во время развития. Наилучшим кандидатом для фактора, регулирующего выживание мотонейрона, является еще пока неидентифицированный лиганд рецептора CNTF[193)].

Избыточная продукция нейронов, после которой следует период гибели клеток, является характерной чертой развития нервной системы позвоночных. Некоторые из нейронов, которые погибают, возможно, не смогли образовать синапсов, или образовали их с неподходящей клеткой-мишенью. В подобных случаях гибель клеток связана с особенностью иннервации[194)]. Однако большинство клеток, которые гибнут, достигают и иннервируют правильные клетки-мишени. Таким образом, гибель клеток является основным механизмом, который поддерживает равновесие между количеством нейронов и их мишеней.

Неожиданной находкой явилось то, что ингибиторы образования мРНК или синтеза белка предотвращали гибель нейронов в отсутствие необходимых им нейротрофинов[195)]. Результаты этих и более поздних экспериментов показали, что гибель нейронов типично происходит путем апоптоза. **Апоптоз** — это процесс, который активирует внутреннюю «суицидальную» программу клетки, которая приводит к упорядоченному (запрограммированному) распаду ДНК и белков в клетке. Существенно, что для этого необходим предварительный синтез протеолитических ферментов или их активаторов[196, 197)].

Уменьшение числа связей и исчезновение полинейрональной иннервации

После того как популяция нейронов, иннервирующих определенную мишень, уменьшается благодаря гибели клеток, оставшиеся нейроны конкурируют друг с другом за синаптическую территорию. Это конкурирование обычно приводит к потере некоторых первично образованных веточек и синапсов («обрезка»)[198)]. Уменьшение числа связей обеспечивает механизм для формирования правильной и полной иннервации мишени определенной популяцией нейронов. В некоторых случаях механизм уменьшения числа связей также обеспечивает механизмы коррекции ошибок[199)]; в других случаях он отражает стратегию поиска пути аксоном[200)].

Особо яркий пример конкурентного уменьшения числа связей можно увидеть в развивающейся скелетной мышце. У взрослых животных каждый мотонейрон иннервирует группу до 300 мышечных волокон, формируя двигательную единицу (глава 22), но каждое мышечное волокно иннервируется только одним аксоном. Однако в развивающейся мышце мотонейроны бурно ветвятся, так что каждое мышечное волокно в итоге иннервируется аксонами от нескольких мотонейронов (рис. 23.36), что называется **полинейрональной иннервацией**[201, 202)]. В каждом развивающемся мышечном волокне синаптические окончания всех аксонов разбросаны вокруг одного участка, вблизи скоплений рецепторов АХ и других компонентов постсинаптического аппарата. По мере развития веточки аксонов исчезают, что приводит в конечном итоге к формированию взрослого паттерна. Этот процесс не вызывает гибель клетки (которая обычно происходит на более ранних стадиях развития), а только уменьшение количества мышечных волокон, иннервируемых каждым из мотонейронов.

Исчезновение полинейронной иннервации регулируется конкуренцией между аксонами различных мотонейронов за синаптическое пространство на мышечных клетках. Наиболее ярким примером являются эксперименты на развивающихся мышцах лапки крысы[203)]. Когда все кроме одного моторные аксоны, иннервирующие эту мышцу, были

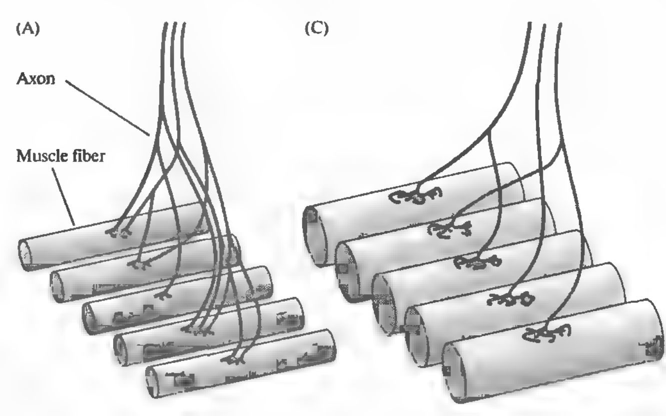


Рис. 23.36. (Рис. 23.36B, 23.36D см. на цветной вклейке после с. 640.) Полинейрональная иннервация и ее исчезновение в нервно-мышечном соединении позвоночных. (A) Во время развития эмбриона веточки аксонов моторных нейронов иннервируют множество мышечных волокон, и каждое мышечное волокно иннервируется несколькими мотонейронами (полинейрональная иннервация). (B) Флуоресцентная микрограмма нервно-мышечного соединения мыши (стадия E18), показывающая распределение терминалей двух аксонов, каждый из которых помечен при помощи липофильной метки. В период полинейрональной иннервации терминальные ветвяения аксонов мотонейронов, иннервирующих определенное мышечное волокно, переплетаются в областях отдельных синапсов. (C) После рождения полинейрональная иннервация исчезает по мере того, как веточки аксонов подвергаются ретракции, в результате чего каждое мышечное волокно получает иннервацию только от одного мотонейрона. (D) Флуоресцентная микрофотография нервно-мышечного соединения мыши во время исчезновения полинейрональной иннервации. Два аксона, иннервирующих синапс, были помечены как в B. Все терминали одного аксона исчезли, и сам аксон подвергся ретракции.

Fig. 23.36. Polyneuronal Innervation and Its Elimination at the vertebrate skeletal neuromuscular junction. (A) During embryonic development, motor axons branch to innervate many muscle fibers, and each muscle fiber is innervated by several motor axons (polyneuronal innervation). (B) Fluorescence micrograph of a neuromuscular junction of an E18 mouse showing the distribution of terminals of two axons, each labeled with a lipophilic probe. During the period of polyneuronal innervation, the terminal arbors of all motor axons innervating a particular muscle fiber interdigitate at a single synaptic site. (C) After birth, polyneuronal innervation is eliminated as axon branches retract, leaving each muscle fiber innervated by a single motor axon. (D) Fluorescence micrograph of a mouse neuromuscular junction during the period of removal of polyneuronal innervation. Two axons innervating the junction were labeled as in B. All terminals of one axon have been eliminated, and the axon is being withdrawn. (Micrographs kindly provided by J. W. Lichtman.)

перерезаны на раннем этапе развития, оставшийся аксон подвергся ветвлению и начал иннервировать большое количество волокон данной мышцы. В то время, когда обычно происходит исчезновение полинейрональной иннервации, ни один синапс не исчез. В отсутствие конкуренции для выживания мотонейрон поддерживает контакты с каждой миофибриллой, которую он ранее иннервировал. В экспериментах Лихтмана с коллегами были получены яркие картинки этого процесса при помощи визуализирования нервных терминалей у животных *in vivo* при помощи витальных красителей и наблюдения за изменениями синаптической структуры во время исчезновения синапсов[204, 205]. Подобная же ретракция избыточного количества связей была показана в автономном ганглии неонатальных крыс и морских свинок[206]. Каждая ганглионарная клетка первоначально получает большое количество связей, больше пяти, однако к возрасту 5 недель из них обычно остается только одна.

Активность нервов и исчезновение синапсов

Физиологические эксперименты показывают, что активность нейронов играет определенную роль в исчезновении синапсов, влияя как на интенсивность, так и на и результат конкуренции между терминалями аксонов. Стимулирование мышцы через нерв при помощи имплантированных металлических электродов увеличивает интенсивность исчезновения синапсов[207, 208]. Уменьшение активности путем добавления тетродотоксина в пространство вокруг нерва для блокирования потенциалов действия приводит к ингибированию синаптической передачи и замедлению исчезновения синапсов[209, 210]. На мышцах, которые получают сигналы от аксонов двух различных нервов, возможно проведение интересных экспериментов по блокированию проведения импульсов избирательно в одном из нервов[211, 212]. В таких случаях неактивные нейроны не могут, очевидно, нормально конкурировать: аксоны блокированных нейронов

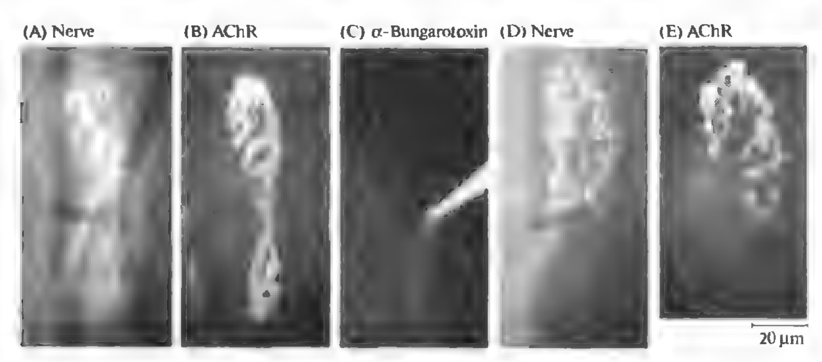


Рис. 23.37. Конкуренция между веточками одного мотонейрона, зависящая от активности. (A, B) Флуоресцентные микрофотографии нервно-мышечного соединения грудинососцевидной мышцы мыши, показывающие пресинаптическую терминаль (A), окрашенную при помощи 4–Di-2-Asp (который окрашивает митохондрии) и постсинаптическую мембрану (B), окрашенную при помощи родамин-связанного α-бунгаротоксина в низкой дозе (который окрашивает рецепторы АХ). (C) Рецепторы АХ в нижней части соединения блокированы при помощи насыщающей дозы немеченного α-бунгаротоксина, что приводит к блокаде нервно-мышечной передачи селективно в этой области синапса. (D, E) Через 31 день тот же самый синапс, что показан на A и B, был заново исследован. Терминаль аксона (D) и постсинаптические рецепторы (E) исчезли из блокированной области. Таким образом локальная блокада передачи приводит к локальному исчезновению синапса.

Fig. 23.37. Activity-Dependent Competition between Branches of a single motor axon. (A, B) Fluorescence micrographs of a neuromuscular junction in the mouse sternomastoid muscle showing the presynaptic terminal (A), stained with 4–Di-2-Asp (which labels mitochondria) and the postsynaptic membrane (B), stained with a low dose of rhodamine-conjugated α-bungarotoxin (which labels ACh receptors). (C) ACh receptors in the lower part of the junction are blocked by a saturating dose of unlabeled α-bungarotoxin, which results in a blockade of neuromuscular transmission selectively in this portion of the junction. (D, E) After 31 days, the same junction is labeled as in A and B and reexamined. Both the axon terminal (D) and the postsynaptic ACh receptors (E) have been removed from the blocked region. Thus, focal blockade of transmission resulted in focal synapse elimination. (After Balice-Gordon and Lichtman, 1994; micrographs kindly provided by J. W. Lichtman.)

иннервируют двигательных единиц меньше, чем в норме; аксоны активных нервов иннервируют волокон больше, чем обычно. Однако доминирование неблокированных нервных волокон не полное, что говорит о роли других факторов, кроме активности, в исчезновении синапсов.

Конкуренция в зависимости от активности также происходит на уровне веточек отдельного аксона двигательного нейрона[213)]. Если в небольшой области зрелого синапса произвести точечную аппликацию α-бунгаротоксина, то неактивный регион синапса подвергается элиминации (рис. 23.37). Если же блокировать весь синапс, его исчезновения не происходит. Молекулярные механизмы этой конкуренции, а также механизмы, посредством которых активность влияет на исчезновение синапсов, пока не открыты.

Сходная конкуренция за синаптические мишени возникает во время развития нервных путей в ЦНС[214)]. Примером может служить образование глазодоминантных колонок в зрительной коре (глава 25), где аксоны из ядра ЛКТ, несущие информацию от разных глаз, первоначально значительно перекрываются в слое 4 коры, но затем формируются колонки правого и левого глаза. Таким образом, паттерн активности терминалей от обоих глаз играет решающую роль в определении результата этой конкуренции.

Нейротрофины и уменьшение количества связей

Уменьшение количества связей может возникать вследствие конкуренции за ограниченное количество трофических факторов, вырабатываемых клеткой-мишенью. Например, при развитии зрительной коры добавление избыточного количества МНФ блокирует образование колонок глазного доминирования, предотвращая потерю веточек аксонами ЛКТ (глава 25)[215)]. Эксперименты на симпатических нейронах, выращиваемых в трехсекционных камерах, могут также быть примером того, что обеспечение нейротрофинами может определять выживание или гибель индивидуальных веточек нейронов (см. рис. 23.33)[216)].

В этом эксперименте среда во всех трех секциях изначально содержала ФРН. Клетки помещались в центральную секцию, а их отростки направлялись в каждую из двух боковых секций. ФРН затем удалялся из одной из боковых секций. Аксоны в центральной секции и в боковой секции, которая содержала ФРН, выживали, а аксоны в секции, из которой был удален ФРН, подвергались дегенерации (рис. 23.33С). Таким образом, в пределах ткани-мишени конкуренция между терминалями аксона за ограниченное количество нейротрофинов может приводить к изменениям синаптического ветвления аксонов, способствовать росту одних веточек и дегенерации других.

§ 10. Общие размышления о нейронной специфичности

В последнее время наблюдается значительный прогресс в нашем понимании того, как нервная клетка находит свои мишени и устанавливает связи. Однако когда начинаешь рассуждать о несчетном количестве связей, которые должны сформироваться во время развития нервной системы, проблема нервной специфичности кажется просто пугающей. Даже банальная аналогия имеет очень сильный эффект. Представим, что мы не знаем ничего об устройстве и работе почтовой системы. Глава этой книги о нервной системе, без иллюстраций, отправляется из Триеста, Италия в Сандерланд, Массачусетс, куда она доходит за несколько дней. Как это происходит? Автор этой книги знает только ближайший к нему почтовый ящик и даже не знает, где находится почтовое отделение его района. Почтовый работник, который вынимает письма из ящика, знает, где находится почтовое отделение; там есть клерк, который может не знать, где находится Сандерланд, однако он знает, что посылку надо послать в аэропорт, и так далее, в нужную страну, город, улицу, здание и в конце концов конкретному человеку. Если этого не достаточно, то иллюстрации к главе высылаются из Денвера и Балтимора по тому же адресу, и они приходят почти одновременно с текстом из Триеста. После чего почта идет через те же самые почтовые ящики и отделение в обратном направлении к исходным отправителям.

Важной особенностью этой аналогии является то, что проблема кажется непостижимой на первый взгляд. Конечно, можно разгадать эту загадку с почтой, следуя за письмом шаг за шагом, пока оно не достигнет своего адресата. Это позволит выявить некоторые моменты в логике и структуре организации почты (не раскрывая сущность создателя этой системы). На каждом ее шаге выполняется ограниченное количество инструкций и используется ограниченное количество средств.

Некоторые механизмы нервной специфичности могут быть похожи на эту систему. Ганглиозная клетка сетчатки посылает свои отростки за пределы глаза, где они образуют зрительный нерв вместе с отростками других ганглиозных клеток сетчатки. Зрительный перекрест представляет следующую точку выбора, где решение о том, к какому, правому или левому, ЛКТ должен направляться отросток, может быть принято на основе химических сигналов. В ЛКТ аксоны сетчатки могут организовываться и иннервировать мишени основываясь на градиенте молекул-репеллентов. Аксоны нейронов ЛКТ подобным же образом следуют к своим мишеням в коре, останавливаясь на пути для формирования временных связей с промежуточными нейронами. Таким образом, задача по формированию специфических связей между ганглиозными клетками сетчатки и нейронами зрительной коры, кажущаяся такой сложной, может быть разбита на серию относительно простых, независимых шагов. Более того, при формировании связей во время развития расстояния между шагами очень малы; пути значительно удлиняются по мере созревания нервной системы.

Выводы

- У позвоночных в период эмбриогенеза происходит диффузия протеинов из Шпемановских организационных центров, что приводит к формированию нервной пластинки, края которой загибаются вверх и формируют нервную трубку.
- Клетки, расположенные в стенках нервной трубки, быстро делятся. Постмитотические нейроны и клетки-предшественники глии мигрируют в различных направлениях с вентральной поверхности нервной трубки и образуют ЦНС.
- Миграция нейронов происходит вдоль радиально расположенных глиальных клеток и клеточных путей, обозначенных раз-

личными метками на поверхности клеток и компонентами экстраклеточного матрикса.

- Конечное идентифицирование клеток определяется их происхождением и индукционными взаимодействиями с другими клетками.
- Гомеотические гены являются управляющими генами, которые контролируют и координируют экспрессию групп других генов и, таким образом, определяют формирование различных частей тела.
- В ЦНС позвоночных судьба развивающихся нейронов зависит в первую очередь от их расположения в рострокаудальном направлении и уже затем от расположения в дорзовентральном направлении. *Hox* семейство гомеотических генов определяет идентифицирование клеток в зависимости от расположения в рострокаудальном направлении в заднем мозге. Белок, называемый Sonic hedgehog («Звучащий ежик»), синтезируемый в области хорды, управляет судьбой клеток, расположенных вентрально вдоль нервной трубки.
- Сигналы, управляюшие дифференцировкой клеток, очень часто передаются через рецептор, связанный с тирозинкиназой, активирующей сложные внутриклеточные сигнальные каскады, которые приводят к изменениям в экспрессии генов. Примером подобной регуляции является развитие фоторецептора *Drosophila.*
- В коре ГМ млекопитающих развитие происходит таким способом, что нейроны, расположенные в более глубоких слоях, рождаются первыми.
- Нейроны нервного гребня возникают у края нервной складки и мигрируют из нервной трубки, образуя ПНС, пигментные клетки, а также кости черепа.
- Постоянное деление стволовых нервных клеток в ЦНС взрослых птиц и млекопитающих приводит к образованию новых нервных клеток.
- Кончик растущего аксона вытягивается, образуя конус роста.
- Поверхность клеток и молекулы адгезии, расположенные во внеклеточном матриксе, управляют конусом роста при помощи привлекающих и отталкивающих механизмов, действующих на короткой дистанции.
- Нетрины играют роль хемоаттрактантов, а семафорины — хеморепеллентов, действующих на большой дистанции, для многих типов аксонов.
- Эфрины (Ephrines) и Eph семейство рецепторов, связанных с тирозинкиназой, при помощи хемореппелентных механизмов управляют процессом поиска пути нервом, миграцией клеток и образованием связей между клетками.
- При соприкосновении конуса роста с мышечной клеткой в течение нескольких последующих минут устанавливается функционирующая нервно-мышечная передача.
- Выделение агрина из пресинаптических терминалей вызывает образование постсинаптической специализации в скелетной мышце.
- Нейронам для выживания и дифференцировки необходимы различные трофические факторы.
- Запрограммированная гибель нейронов довольно частое явление в развитии нервной системы.
- Синаптические связи, установленные однажды, в дальнейшем могут изменяться для обеспечения надежной и полной иннервации своей мишени. Перемоделирование связей осуществляется на основе конкуренции между терминалями аксона за нейротрофические факторы, выделяемые клеткой-мишенью в зависимости от активности терминалей.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Capecchi, M. R. 1997. Hox genes and mammalian development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62: 273–281.
- Dupin, E., Ziller, C., and Le Douarin, N. M. 1998. The avian embryo as a model in developmental studies: Chimeras and in vitro clonal analysis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 36: 1–35.
- Frade, J. M., and Barde, Y. A. 1998. Nerve growth factor: Two receptors, multiple functions. *BioEssays* 20: 137–145.
- Francis, N. J., and Landis, S. C. 1999. Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 541–566.

- Gilbert, S. F. 2000. *Developmental Biology*, 6th Ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Levi-Montalcini, R. 1982. Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor. *Annu. Rev. Neurosci.* 5: 341–362.
- Lumsden, A., and Krumlauf, R. 1996. Patterning the vertebrate neuroaxis. *Science* 274: 1109–1115.
- McAllister, A. K., Katz, L. C., and Lo, D. C. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 295–318.
- McConnell, S. K. 1995. Constructing the cerebral cortex: Neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15: 761–768.
- Mueller, B. K. 1999. Growth cone guidance: First steps towards a deeper understanding. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 351–388.
- O'Leary, D. D., and Wilkinson, D. G. 1999. Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 65–73.
- Oppenheim, R. W. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 453–501.
- Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 389–442.
- Song, H-J., and Poo, M–M. 1999. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 355–363.
- Walsh, F. S., and Doherty, P. 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 425–456.
- Zigmond, M. J., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L., and Squire, L. R. (eds.). 1999. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, New York.

Статьи

- Anderson, M. J., and Cohen, M. W. 1977. Nerve-induced and spontaneous redistribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J. Physiol.* 268: 757–773.
- Balice-Gordon, R. J., and Lichtman, J. W. 1993. In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 13: 834–855.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L. R., and Ericson, J. 1999. Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signaling. *Nature* 398: 622–627.
- Brown, M. C., Jansen, J. K. S., and Van Essen, D. 1976. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J. Physiol.* 261: 387–422.
- Campenot, R. B. 1982. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II. Local control of neurite survival by nerve growth factor. *Dev. Biol.* 93: 13–21.
- Cox, E. C., Muller, B., and Bonhoeffer, F. 1990. Axonal guidance in the chick visual system: Posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. *Neuron* 4: 31–47.
- Craig, A. M., Blackstone, C. D., Huganir, R. L., and Banker, G. 1994. Selective clustering of glutamate and γ-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding transmitters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12373–12377.
- Ghosh, A., Antonini, A., McConnell, S. K., and Shatz, C. J. 1990. Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347: 179–181.
- Gomez, T. M., and Spitzer, N. C. 1999. In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* 397: 350–355.
- Hollyday, M., and Hamburger, V. 1976. Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp. Neurol.* 170: 311–320.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R., and Tessier-Lavigne, M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78: 425–435.
- Lumsden, A. G. S., and Davies, A. M. 1986. Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system. *Nature* 323: 538–539.
- Luskin, M. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11: 173–189.
- Luskin, M. B., Pearlman, A. L., and Sanes, J. R. 1988. Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and *in vitro* with a recombinant retrovirus. *Neuron* 1: 635–647.
- Schlaggar, B. L., and O'Leary, D. D. M. 1991. Potential of visual cortex to develop an array of functional units unique to somatosensory cortex. *Science* 252: 1556–1560.
- Song, H-J., Ming, G-L., and Poo, M–M. 1997. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388: 275–279.
- Turner, D. L., and Cepko, C. L. 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328: 131–136.
- Walter, J., Henke-Fahle, S., and Bonhoeffer, F. 1987. Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development* 101: 909–913.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J., and Jessell, T. M. 1991. Control of cell pattern in the developing nervous system: Polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64: 635–647.

Цитированная литература

1. Gilbert, S. F. 2000. *Developmental Biology*, 6th Ed. Sinauer, Sunderland, MA.
2. Zigmond, M. J., et al. (eds.). 1999. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, New York.
3. Quiring, R., et al. 1994. *Science* 265: 785–789.
4. Streisinger, G., et al. 1981. *Nature* 291: 293–296.
5. Detrich, H. W., III, Westerfield, M., and Zon, L. I. 1999. *Methods Cell Biol.* 59: 3–10.
6. Wylie, C. (ed.). Zebrafish Issue. 1996. *Development* 123: 1–481.
7. Sasai, Y. 1998. *Neuron* 21: 455–458.
8. Rakic, P. 1981. *Trends Neurosci.* 4: 184–187.
9. Goldowitz, D. 1989. *Neuron* 2: 1565–1575.
10. Hatten, M. E., Liem, R. K. H., and Mason, C. A. 1986. *J. Neurosci.* 6: 2676–2683.
11. Zheng, C., Heintz, N., and Hatten, M. E. 1996. *Science* 272: 417–419.
12. Anton, E. S., Kreidberg, J. A., and Rakic, P. 1999. *Neuron* 22: 277–289.
13. Wray, S., Grant, P., and Gainer, H. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8132–8136.
14. Bronner-Fraser, M. 1985. *J. Cell Biol.* 101: 610–617.
15. Debby-Brafman, A., et al. 1999. *Neuron* 22: 475–488.
16. Lumsden, A., and Krumlauf, R. 1996. *Science* 274: 1109–1115.
17. Graba, Y., Aragnol, D., and Pradel, J. 1997. *BioEssays* 19: 379–388.
18. Capecchi, M. R. 1997. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62: 273–281.
19. Morrison, A. D. 1998. *BioEssays* 20: 794–797.
20. Boncinelli, E., Mallamaci, A., and Broccoli, V. 1998. *Adv. Genet.* 38: 1–29.
21. Walsh, C. A. 1999. *Neuron* 23: 19–29.
22. Gould, A., Itasaki, N., and Krumlauf, R. 1998. *Neuron* 21: 39–51.
23. Yamada, T., et al. 1991. *Cell* 64: 635–647.
24. Roelink, H., et al. 1995. *Cell* 81: 445–455.
25. Brisco, J., et al. 1999. *Nature* 398: 622–627.
26. Rubenstein, J. L., and Beachy, P. A. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 18–26.
27. Rubenstein, J. L., et al. 1998. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 445–477.
28. Ericson, J., et al. 1995. *Cell* 81: 747–756.
29. Ye, W., et al. 1998. *Cell* 93: 755–766.
30. Lee, K. J., and Jessell, T. M. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 261–294.
31. Simon, H., Hornbruch, A., and Lumsden, A. 1995. *Curr. Biol.* 5: 205–214.
32. Shankland, M. 1995. *J. Neurobiol.* 27: 294–309.
33. Doe, C. Q., and Skeath, J. B. 1996. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 18–24.
34. Sengupta, P., and Bargmann, C. I. 1996. *Dev. Genet.* 18: 73–80.
35. Stent, G. S., et al. 1992. *Int. Rev. Neurobiol.* 33: 109–193.
36. Long, Q., et al. 1997. *Development* 124: 4105–4111.
37. Nelson, B. H., and Weisblat, D. A. 1992. *Development* 115: 103–115.
38. Isaken, D. E., Liu, N. J., and Weisblat, D. A. 1999. Development 126: 3381–3390.
39. Ready, D. 1989. Trends Neurosci. 12: 102–110.
40. Harris, W. A., and Hartenstein, V. 1999. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, New York, pp. 481–517.
41. Zipursky, S. L., and Rubin, G. M. 1994. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 373–397.
42. Dickson, B. J. 1998. *Curr. Biol.* 8: R90–R92.
43. Rossant, J. 1985. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 312: 91–100.
44. Turner, D. L., and Cepko, C. L. 1987. *Nature* 328: 131–136.
45. Luskin, M. B., Pearlman, A. L., and Sanes, J. R. 1988. *Neuron* 1: 635–647.
46. Moriyoshi, K., et al. 1996. *Neuron* 16: 255–260.
47. Cepko, C. L., et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 589–595.
48. McConnell, S. K. 1995. *Neuron* 15: 761–768.
49. Angevine, J. B., and Sidman, R. L. 1961. *Nature* 192: 766–768.
50. Rakic, P. 1974. *Science* 183: 425–427.
51. Luskin, M. B., and Shatz, C. J. 1985. *J. Comp. Neurol.* 242: 611–631.
52. McConnell, S. K. 1988. *J. Neurosci.* 8: 945–974.
53. Caviness, V. S., Jr. 1982. *Dev. Brain Res.* 4: 293–302.
54. D'Arcangelo, G., et al. 1997. *J. Neurosci.* 17: 23–31.
55. Meyer, G., et al. 1998. *J. Comp. Neurol.* 397: 493–518.
56. Howell, B. W., et al. 1997. *Nature* 389: 733–737.
57. Trommsdorff, M., et al. 1999. *Cell* 97: 689–701.
58. Schlaggar, B. L., and O'Leary, D. D. M. 1991. *Science* 252: 1556–1560.
59. O'Leary, D. D. M., et al. 1995. *Ciba Found. Symp.* 193: 214–230.
60. Nottebohm, F. 1989. *Sci. Am.* 260(2): 74–79.
61. Kirn, J. R., and Nottebohm, F. 1993. *J. Neurosci.* 13: 1654–1663.
62. Rasika, S., Alvarez-Buylla, A., and Nottebohm, F. 1999. *Neuron* 22: 53–62.
63. Altman, J., and Das, G. D. 1965. *J. Comp. Neurol.* 124: 319–335.
64. Kornack, D. R., and Rakic, P. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5768–5773.
65. Reynolds, B. A., and Weiss, S. 1996. *Dev. Biol.* 175: 1–13.
66. Johansson, C. B., et al. 1999. *Cell* 96: 25–34.

67. Luskin, M. 1993. *Neuron* 11: 173–189.
68. Yandava, B. G., Billinghurst, L. L., and Snyder, E.Y. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7029–7034.
69. Weston, J. 1970. *Adv. Morphogenesis* 8: 41–114.
70. Dupin, E., Ziller, C., and Le Douarin, N. M. 1998. *Curr. Top. Dev. Biol.* 36: 1–35.
71. Anderson, D. J. 1993. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 129–158.
72. Francis, N. J., and Landis, S. C. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 541–566.
73. Mains, R. E., and Patterson, P. H. 1973. *J. Cell Biol.* 59: 329–345.
74. Patterson, P. H., and Chun, L. L. Y. 1977. *Dev. Biol.* 56: 263–280.
75. Furshpan, E. J., et al. 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 4225–4229.
76. Yamamori, T., et al. 1989. *Science* 246: 1412–1416.
77. Smith, S. J. 1988. *Science* 242: 708–715.
78. Letourneau, P. C. 1996. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 4: 111–123.
79. Lin, C-H., Thompson, C. A., and Forscher, P. 1994. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 640–647.
80. Suter, D. M., et al. 1998. *J. Cell Biol.* 141: 227–240.
81. Grumbacher-Reinert, S., and Nicholls, J. 1992. *J. Exp. Biol.* 167: 1–14.
82. Gomez, T. M., and Spitzer, N. C. 1999. *Nature* 397: 350–355.
83. Walsh, F. S., and Doherty, P. 1997. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 425–456.
84. Takeichi, M. 1995. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 619–627.
85. Lander, A. D. 1989. *Trends Neurosci.* 12: 189–195.
86. Reichardt, L. F., and Tomaselli, K. J. 1991. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 531–570.
87. Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. 1999. *Science* 285: 1028–1032.
88. Bixby, J. L., Lilien, J., and Reichardt, L. F. 1988. *J. Cell Biol.* 107: 353–361.
89. Seilheimer, B., and Schachner, M. 1988. *J. Cell Biol.* 107: 341–351.
90. Langley, J. N. 1895. *J. Physiol.* 18: 280–284.
91. Weiss, P. 1936. *Biol. Rev.* 11: 494–531.
92. Mueller, B. K. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 351–388.
93. Lumsden, A. G. S., and Davies, A. M. 1986. *Nature* 323: 538–539.
94. Phelan, K. A., and Hollyday, M. 1990. *J. Neurosci.* 10: 2699–2716.
95. Bentley, D., and Caudy, M. 1983. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 48: 573–585.
96. Palka, J., Whitlock, K. E., and Murray, M. A. 1992. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 48–54.
97. Sato, Y., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 7800–7810.
98. Deller, T., Drakew, A., and Frotscher, M. 1999. *Exp. Neurol.* 156: 239–253.
99. Del Río, J. A., et al. 1997. *Nature* 385: 70–74.
100. Shatz, C. J., and Luskin, M. B. 1986. *J. Neurosci.* 6: 3655–3658.
101. Luskin, M. B. and Shatz, C. J. 1985. *J. Neurosci.* 5: 1062–1075.
102. Ghosh, A., et al. 1990. *Nature* 347: 179–181.
103. Goodman, C. S. 1996. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 341–377.
104. Brittis, P. A., et al. 1996. *Mol. Cell Neurosci.* 8: 120–128.
105. McFarlane, S., et al. 1996. *Neuron* 17: 245–254.
106. Hoang, B., and Chiba, A. 1998. *J. Neurosci.* 18: 7847–7855.
107. Masuda-Nakagawa, L. M. and Nicholls, J. G. 1991. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 331: 323–335.
108. McKenna, M. P. and Raper, J. A. 1988. *Dev. Biol.* 130: 232–236.
109. Isbister, C. M. and O'Connor, T. P. 1999. *J. Neurosci.* 19: 2589–2600.
110. Tessier-Lavigne, M., et al. 1988. *Nature* 336: 775–778.
111. Kennedy, T. E., et al. 1994. *Cell* 78: 425–435.
112. Fazeli, A., et al. 1997. *Nature* 386: 796–804.
113. Stoeckli, E. T. and Landmesser, L. T. 1995. *Neuron* 14: 1165–1179.
114. Stoeckli, E. T., et al. 1997. *Neuron* 18: 209–221.
115. Kidd, T., et al. 1998. *Cell* 92: 205–215.
116. Kidd, T., Bland, K. S., and Goodman, C. S. 1999. *Cell* 96: 785–794.
117. Colamarino, S. A. and Tessier-Lavigne, M. 1995. *Cell* 81: 621–629.
118. Brose, K., et al. 1999. *Cell* 96: 795–806.
119. Kolodkin, A. L. 1998. *Prog. Brain Res.* 117: 115–132.
120. Luo, Y., et al. 1995. *Neuron* 14: 1131–1140.
121. Fujisawa, H., and Kitsukawa, T. 1998. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 587–592.
122. Song, H.-J., and Poo, M. M. 1999. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 355–363.
123. Ming, G.-L., et al. 1997. *Neuron* 19: 1225–1235.
124. Song, H.-J., Ming, G.-L., and Poo, M.-M. 1997. *Nature* 388: 275–279.
125. Song, H.-J., et al. 1998. *Science* 281: 1515–1518.
126. Walter, J., et al. 1987. *Development* 101: 685–696.
127. Walter, J., Henke-Fahle, S., and Bonhoeffer, F. 1987. *Development* 101: 909–913.
128. Drescher, U., et al. 1995. *Cell* 82: 359–370.
129. O'Leary, D. D. and Wilkinson, D. G. 1999. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 65–73.
130. Cox, E. C., Muller, B., and Bonhoeffer, F. 1990. *Neuron* 4: 31–47.
131. Mellitzer, G., Xu, Q., and Wilkinson, D. G. 1999. *Nature* 400: 77–81.

132. Holder, N., and Klein, R. 1999. *Development* 126: 2033–2044.
133. Dodd, J. and Jessell, T. M. 1988. *Science* 242: 692–699.
134. Ichijo, H. and Bonhoeffer, F. 1998. *J. Neurosci.* 18: 5008–5018.
135. Constantine-Paton, M., Cline, H. T., and Debski, E. 1990. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 129–154.
136. Salpeter, M. M. (ed.). 1987. *The Vertebrate Neuromuscular Junction.* Alan R. Liss, New York.
137. Sanes, J. R., and Lichtman, J. W. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 389–442.
138. Evers, J., et al. 1989. *J. Neurosci.* 9: 1523–1539.
139. Anderson, M. J., and Cohen, M. W. 1977. *J. Physiol.* 268: 757–773.
140. Frank, E., and Fischbach, G. D. 1979. *J. Cell Biol.* 83: 143–158.
141. McMahan, U. J., and Wallace, B. G. 1989. *Dev. Neurosci.* 11: 227–247.
142. Bowe, M. A., and Fallon, J. R. 1995. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 443–462.
143. Denzer, A. J., et al. 1998. *EMBO J.* 17: 335–343.
144. Gautam, M., et al. 1996. *Cell* 85: 525–535.
145. Burgess, R. W., et al. 1999. *Neuron* 23: 33–44.
146. DeChiara, T. M.. et al. 1996. *Cell* 85: 501–512.
147. Gautam, M., et al. 1995. *Nature* 377: 232–236.
148. Fischbach, G. D., and Rosen, K. M. 1997. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 429–458.
149. Cohen, I., et al. 1997. *Mol. Cell. Neurosci.* 9: 237–253.
150. Noakes, P. G., et al. 1995. *Nature* 374: 258–262.
151. Craig, A. M., et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12373–12377.
152. Rao, A., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 1217–1229.
153. Koulen, P. et al. 1998. *Euro. J. Neurosci.* 10: 115–127.
154. Wassle, H., et al. 1998. *Vision Res.* 38: 1411–1430.
155. Sassoe-Pognetto, M., and Wassle, H. 1997. *J. Comp. Neurol.* 381: 158–174.
156. Dolkart-Gorin, P. and Johnson, E. M. 1979. *Proc. Natl. Acad. Scl. USA* 76: 5382–5386.
157. Crowley, C., et al. 1994. *Cell* 76: 1001–1011.
158. Smeyne, R. J., et al. 1994. *Nature* 368: 246–249.
159. Campenot, R. B. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4516–4519.
160. Hendry, I. A., et al. 1974. *Brain Res.* 68: 103–121.
161. Black, I. B. 1978. *Annu. Rev. Neurosci.* 1: 183–214.
162. Levi-Montalcini, R. 1982. *Annu. Rev. Neurosci.* 5: 341–362.
163. Hamburger, V. 1939. *Physiol. Zool.* 12: 268–284.
164. See Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. U. 1968. *Physiol. Rev.* 48: 534–569 for references to earlier work.
165. Cohen, S. 1959. *J. Biol. Chem.* 234: 1129–1137.
166. Cohen, S. 1960. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46: 302–311.
167. Levi-Montalcini, R. and Cohen, S. 1960. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 85: 324–341.
168. Greene, L. A., and Shooter, E. M. 1980. *Annu. Rev. Neurosci.* 3: 353–402.
169. Barde, Y-A. 1989. *Neuron* 2: 1525–1534.
170. Lewin, G. R., and Barde, Y-A. 1996. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 289–317.
171. McDonald, N. Q., and Chao, M. V. 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 19669–19672.
172. Farinas, I., et al. 1996. *Neuron* 17: 1068–1078.
173. Kokaia, Z., et al. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6711–6715.
174. Davies, A. M., and Lumsden, A. 1990. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 61–73.
175. Gage, F. H., et al. 1988. *J. Comp. Neurol.* 269: 147–155.
176. Fischer, W., Gage, F. H., and Bjorklund, A. 1989. *Eur. J. Neurosci.* 1: 34–45.
177. Fischer, W., et al. 1991. *J. Neurosci.* 11: 1889–1906.
178. Winkler, J., et al. 1998. *J. Mol. Med.* 76: 555–567.
179. Alcantara, S., et al. 1997. *J. Neurosci.* 17: 3623–3633.
180. McAllister, A. K., Katz, L. C., and Lo, D. C. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 295–318.
181. Conover, J. C., and Yancopoulos, G. D. 1997. *Rev. Neurosci.* 8: 13–27.
182. Bothwell, M. 1995. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 223–253.
183. Frade, J. M., and Barde, Y. A. 1998. *BioEssays* 20: 137–145.
184. Segal, R. A., and Greenberg, M. E. 1996. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 463–489.
185. Frade, J. M., Rodriguez-Tebar, A., and Barde, Y-A. 1996. *Nature* 383: 166–168.
186. Truman, J. W., Thorn, R. S., and Robinow, S. 1992. *J. Neurobiol.* 23: 1295–1311.
187. Oppenheim, R. W. 1991. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 453–501.
188. Hollyday, M., and Hamburger, V. 1976. *J. Comp. Neurol.* 170: 311–320.
189. Sendtner, M., Holtmann, B., and Hughes, R. A. 1996. *Neurochem. Res.* 21: 831–841.
190. Oppenheim, R. W., et al. 1995. *Nature* 373: 344–346.
191. Caroni, P., and Grandes, P. 1990. *J. Cell Biol.* 110: 1307–1317.
192. McManaman, J. L., Haverkamp, L. J., and Oppenheim, R. W. 1991. *Adv. Neurol.* 56: 81–88.
193. DeChiara, T. M., et al. 1995. *Cell* 83: 313–322.
194. O'Leary, D. D. M., Fawcett, J. W., and Cowan, W. M. 1986. *J. Neurosci.* 6: 3692–3705.
195. Martin, D. P., et al. 1988. *J. Cell Biol.* 106: 829–844.
196. Friedlander, R. M., and Yuan, J. 1998. *Cell Death Differ.* 5: 823–831.

197. Bergmann, A., Agapite, J., and Steller, H. 1998. *Oncogene* 17: 3215–3223.
198. O'Leary, D. D. 1992. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 70–77.
199. Nakamura, H., and O'Leary, D. D. M. 1989. *J. Neurosci.* 9: 3776–3795.
200. O'Leary, D. D. M., and Terashima, T. 1988. *Neuron* 1: 901–910.
201. Redfern, P.A. 1970. *J. Physiol.* 209: 701–709.
202. Brown, M. C., Jansen, J. K. S., and Van Essen, D. 1976. *J. Physiol.* 261: 387–422.
203. Betz, W. J., Caldwell, J. H., and Ribchester, R. R. 1980. *J. Physiol.* 303: 265–279.
204. Balice-Gordon, R. J., and Lichtman, J. W. 1993. *J. Neurosci.* 13: 834–855.
205. Gan, W-B., and Lichtman, J. W. 1998. *Science* 282: 1508–1511.
206. Purves, D., and Lichtman, J. W. 1983. *Annu. Rev. Physiol.* 45: 553–565.
207. O'Brien, R. A. D., Ostberg, A. J. C., and Vrbova, G. 1978. *J. Physiol.* 282: 571–582.
208. Thompson, W. 1983. *Nature* 302: 614–616.
209. Thompson, W., Kuffler, D. P., and Jansen, J. K. S. 1979. *Neuroscience* 4: 271–281.
210. Brown, M. C., Hopkins, W. G., and Keynes, R. J. 1982. *J. Physioi.* 329: 439–450.
211. Ribchester, R. R., and Taxt, T. 1983. *J. Physiol.* 344: 89–111.
212. Ribchester, R. R., and Taxt, T. 1984. *J. Physiol.* 347: 497–511.
213. Balice-Gordon, R. J., and Lichtman, J. W. 1994. *Nature* 372: 519–524.
214. Katz, L. C., and Shatz, C. J. 1996. *Science* 274: 1133–1138.
215. Cabelli, R. J., Hohn, A., and Shatz, C. J. 1995. *Science* 267: 1662–1666.
216. Campenot, R. B. 1982. *Dev. Biol.* 93: 13–21.

Глава 24

Денервация и регенерация синаптических связей

В нервной системе позвоночных при нарушении целостности аксона происходит дегенерация дистальной части этого отростка. Кроме того, развивается комплекс дегенеративных явлений в самом поврежденном нейроне, в иннервируемой им клетке, а также в нейроне, являющемся пресинаптическим по отношению к поврежденному. Изменения происходят вследствие нарушения аксонального транспорта трофических факторов, которые контролируют нейрональную дифференцировку и выживание нейронов, а также как результат перестройки паттерна электрической активности.

Волокна скелетной мышцы позвоночных после денервации становятся более чувствительными к ацетилхолину и начинают экспрессировать ацетилхолиновые рецепторы по всей своей поверхности. Прямая электрическая стимуляция денервированных гиперчувствительных мышц приводит к сужению участка, чувствительного к ацетилхолину, до размеров исходной концевой пластинки. Активность мышцы влияет также на скорость оборота ацетилхолиновых рецепторов. Эффекты активности опосредуются входом ионов кальция в клетку и активацией внутриклеточных вторичных посредников. В отличие от иннервированных мышечных волокон, денервированные мышцы допускают иннервацию в любом месте своей поверхности. Денервированные мышечные волокна не только обладают повышенной склонностью к реиннервации, но даже стимулируют неповрежденные нервные окончания к разрастанию и формированию новых отростков (спраутинг). Подобным же образом нейроны, лишенные иннервации, становятся гиперчувствительными к трансмиттерам и стимулируют развитие близлежащих нервных окончаний.

Способность поврежденных аксонов к регенерации и реиннервации исходных мишеней колеблется в широких пределах от вида к виду. У безпозвоночных и низших позвоночных, таких как лягушки и тритоны, поврежденные аксоны успешно регенерируют и с высокой точностью восстанавливают исходные синаптические контакты. К этому способны и аксоны у эмбрионов и новорожденных высших позвоночных, включая млекопитающих. У высших позвоночных аксоны периферической нервной системы взрослых животных также отрастают после их повреждения. Если периферический нерв был передавлен, регенерирующие аксоны направляются к их исходным периферическим мишеням с помощью эндоневрия и базальной мембраны шванновских клеток. В результате этого возможно полное восстановление потерянной функции. Если же периферический нерв был перерезан, реиннервация мишеней бывает часто неполная и неточная. Аргин и другие факторы, ассоциированные с синаптической частью базальной мембраны мышечного волокна, инициируют образование специализированных пре- и постсинаптической структур в регенерирующем нерве и мышечных клетках.

Для центральной нервной системы взрослых млекопитающих способность к регенерации весьма ограничена. Нейроны ЦНС взрослых млекопитающих обладают способностью к спраутингу и формированию новых синапсов только на коротких дистанциях. Рост аксонов на большие расстояния может происходить или через трансплантаты, полученные из периферических нервов, или через неповрежденные участки ЦНС. Кроме того, эмбриональные нейроны и стволовые клетки, имплантированные в ЦНС взрослых животных, способны к дифференцировке, удлинению отростков и могут адекватно интегрироваться в сохранившиеся нейрональные сети. Техника трансплантации позволяет надеяться на преодоление функционального дефицита, возникающего в результате повреждений ЦНС и нейродегенеративных заболеваний.

Нервная система многих видов имеет поразительную способность успешно восстанавливать специфические синаптические соединения, которые были нарушены в результате травмы. Регенеративные способности нейронов ЦНС впервые были продемонстрированы Матти, который в 1920-х годах рассек оптический нерв тритона и обнаружил, что зрение у этого животного было восстановлено в течение нескольких недель после операции[1]. В начале 1940-х годов Сперри, Стоун и их коллеги, используя эти регенеративные возможности, исследовали, по какому механизму формируются специфические соединения в нервной системе. Их эксперименты по регенерации зрительной системы лягушек и рыб подтвердили идею, согласно которой нейроны селективно иннервируют свои мишени уже во время регенерации, а не создают первичные случайные контакты, реорганизуемые позднее[2]. Позже детальные исследования, проведенные на пиявках, сверчках и речных раках, убедительно продемонстрировали, что аксоны идентифицированных нейронов безпозвоночных после перерезки способны найти и точно соединиться с исходными синаптическими партнерами, игнорируя множество других потенциальных мишеней. В противоположность этому, регенерация поврежденных нервных соединений в нервной системе взрослого млекопитающего либо является лишь частичной, либо отсутствует вовсе.

В этой главе мы опишем изменения, которые происходят в нейроне и окружающих глиальных клетках после пересечения аксона, а также эффекты денервации, развивающиеся в постсинаптических клетках-мишенях. Затем мы рассмотрим способность нейронов развивать новые аксоны, восстанавливать синаптические контакты с клетками-мишенями и компенсировать утраченные функции. Наконец, мы обсудим возможность восстановления нейронов, утраченных в результате травмы или заболевания.

§ 1. Изменения в аксотомированных нейронах и окружающих глиальных клетках

Валлеровская дегенерация

После перерезки чувствительных или двигательных волокон периферического нерва наблюдается характерная очередность морфологических и функциональных изменений (рис. 24.1)[4]. Прежде всего дегенерации подвергается дистальная часть этого волокна, а также небольшой участок проксимальной части нерва. Шванновские клетки, формирующие миелиновую оболочку дистального сегмента нерва, дегенерируют, пролиферируют и вместе с макрофагами фагоцитируют аксональные и миелиновые остатки. Такая реакция названа **перерождением Валлера** по имени анатома девятнадцатого столетия Августа Валлера, впервые описавшего ее. Клеточное тело и ядро разбухают, ядро перемешается из своего типичного положения в центре на периферию. Кроме того, нарушается упорядоченное строение части шероховатого эндоплазматического ретикулума, которая называется **субстанцией Ниссля**. Снижение интенсивности окраски субстанции Ниссля, следующее за аксотомией, известно как **хроматолиз**.

Через несколько часов после перерезки начинается рост новых аксональных отростков, происходящих от перерезанного конца нервного волокна, и процесс регенерации. Если нейрон успешно восстановил контакт с мишенью, клеточное тело приобретает исходный внешний вид. Хроматолиз происходит не только в периферических нервах, но также и после повреждения аксонов в центральной нервной системе.

В организме взрослых животных реакция нейронов, не восстановивших контактов со своими мишенями, может быть различной[5, 6]. Пересечение аксонов оптического нерва приводит к быстрой гибели ганглиозных клеток сетчатки. Большинство клеток переднего базального таламуса выживают после повреждений коры, хотя при этом они существенно атрофируются. Чувствительные нейроны задних корешков спиниого мозга и мотонейроны после перерезки их аксонов в периферическом нерве, как правило, погибают. Немногие выжившие при этом клетки в значительной степени атрофируются. Большинство аксотомированных клеток автономного ганглия выживают, но они уменьшаются в размерах и становятся менее чувствительными к ацетилхолину.

Ретроградные транссинаптические эффекты аксотомии

Аксотомия может также вызывать изменения в нейронах, посылающих синаптический сигнал к поврежденной клетке. Например, по-

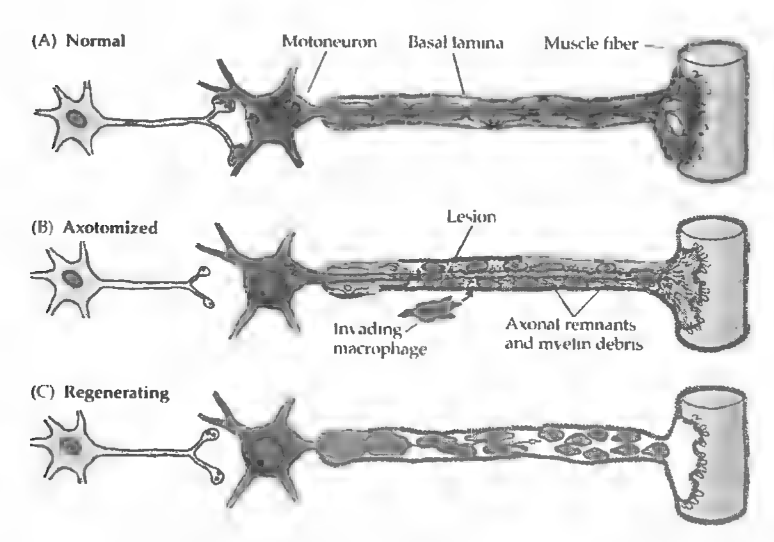


Рис. 24.1. Дегенеративные изменения после аксотомии. (А) Типичный мотонейрон взрослого позвоночного. (В) После аксотомии нервное окончание, дистальный участок аксона и короткий отрезок проксимального участка аксона подвергаются дегенерации. Шванновские клетки утрачивают способность к дифференцировке, пролиферируют и вместе с вторгшимися микроглиальными клетками и макрофагами фагоцитируют аксональные и миелиновые остатки. Аксотомированный нейрон подвергается хроматолизу, пресинаптические окончания подвергаются ретракции. Дегенеративные изменения могут происходить в пре- и постсинаптических клетках. (С) Аксон регенерирует вдоль колонок шванновских клеток внутри эндоневральной трубки и базальной мембраны, окружавшей исходный аксон.

Fig. 24.1. Degenerative Changes After Axotomy. (A) A typical motoneuron in an adult vertebrate. (B) After axotomy, the nerve terminal, the distal segment of the axon, and a short length of the proximal segment of the axon degenerate. Schwann cells dedifferentiate, proliferate, and, together with invading microglial cells and macrophages, phagocytize the axonal and myelin remnants. The axotomized neuron undergoes chromatolysis, presynaptic terminals retract, and degenerative changes may occur in pre- and postsynaptic cells. (C) The axon regenerates along the column of Schwann cells within the endoneurial tube and sheath of basal lamina that had surrounded the original axon.

сле аксотомии клеток автономного ганглия цыпленка, крысы или морской свинки, синаптические сигналы в клетках ганглия становятся менее эффективными[7)–9)]. Это отчасти является результатом сниженной чувствительности аксотомированной клетки к нейротрансмиттеру ацетилхолину. Кроме того, как результат ретроградных транссинаптических влияний, происходит ретракция пресинаптических окончаний, а оставшиеся терминали освобождают меньше квантов трансмиттера (рис. 24.2)[10)]. Таким образом, повреждение нейрона нарушает его способность поддерживать высокоэффективный пресинаптический сигнал. Ротшенкер показал и другой пример ретроградного транссинаптического влияния, наблюдаемый в мотонейронах лягушки и мыши[11)]. После перерезки моторного нерва на одной стороне тела происходит формирование новых синапсов и спраутинг аксонов интактных мотонейронов, иннервирующих соответствующую мышцу другой стороны тела. Сигнал распространяется от аксотомированных нейронов, пересекает спинной мозг и воздействует на неповрежденные мотонейроны на другой стороне животного. Важно отметить, что мотонейроны, иннервирующие другие мышцы, при этом не затрагиваются.

Трофические субстанции и эффекты аксотомии

Ряд эффектов аксотомии — хроматолиз, атрофия нейронов и гибель клеток — является результатом утраты трофических веществ, продуцируемых тканями-мишенями и транспортируемых по аксону ретроградно с периферии по направлению к телу клетки[12)]. Хорошим примером этого является действие фактора роста нервов (NGF) на сенсорные и симпатические нейроны, обсуждаемое в главе 23. Так, в автономном ганглии морской свинки эффекты аксотомии воспроизводятся подкожными инъекциями антител к фактору роста нервов или блокированием ретроградного транспорта в постганглионарных нервах. Напротив, эффекты аксотомии в значительной мере предотвращаются аппликацией NGF на ганглий[13)]. Подобным же образом ретроградная транссинаптическая атрофия может быть результатом снижения продукции трофических факторов поврежденными нейронами.

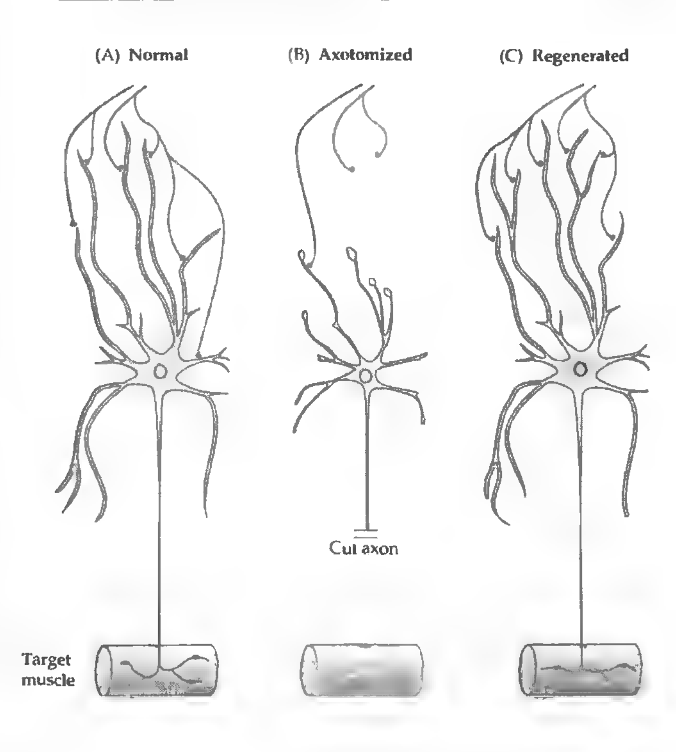


Рис. 24.2. Атрофия клеток аксотомированного автономного ганглия и потеря пресинаптических входов. (А) Нормальный нейрон. (В) Через несколько дней после аксотомии нейроны атрофируются, большая часть дендритов приобретает варикозные расширения. Многие пресинаптические окончания подвергаются ретракции, а оставшиеся освобождают меньше трансмиттера. (С) Если постганглионарный аксон регенерирует и реиннервирует свою периферическую мишень, свойства клетки и синаптических входов восстанавливаются.

Fig. 24.2. Axotomized Autonomic Ganglion Cells Atrophy and Lose Presynaptic Inputs. (A) Normal neuron. (B) Within a few days after axotomy, neurons atrophy and many dendrites show large varicosities. Many presynaptic terminals retract from dendrites; those that remain release less transmitter. (C) If the postganglionic axon regenerates and reinnervates its peripheral target, the cell and synaptic inputs recover. (After Purves, 1975.)

§ 2. Эффекты денервации на постсинаптические клетки

Нервно-мышечный синапс является удобной моделью для изучения механизмов синаптической передачи, которые приложимы не только к периферическим, но и к центральным синапсам. Сходным образом процессы, происходящие в денервированных мышцах, могут быть хорошим аналогом того, к чему приводит устранение синаптических входов в нейронах ЦНС[14].

Денервированная мышечная мембрана

В конце девятнадцатого столетия в денервированной скелетной мышце был обнаружен феномен спонтанных асинхронных сокращений, названных **фибрилляциями**. Фибрилляции инициировались самой мышечной мембраной, а не АХ[15], хотя большинство спонтанных потенциалов действия, вызывающих фибрилляцию, исходило из участка бывшей концевой пластинки[16]. Начало фибрилляций у крыс, морских свинок или кроликов наблюдалось через 2–5 дней после денервации, тогда как у обезьян и человека этот латентный период занимал более недели.

К моменту начала фибрилляций волокна мышц млекопитающих становятся гиперчувствительными к различным химическим агентам. Это значит, что концентрация веществ, требуемых для возбуждения мышцы, снижается в сотни или тысячи раз. Например, денервированная скелетная мышца млекопитающего примерно в 1000 раз более чувствительна к АХ, добавленному непосредственно в омывающий раствор или инъецированному в артерию, снабжающую мышцу, чем нормально иннервированная мышца[17]. Потенциал действия в денервированных мышцах также меняется, становясь более устойчивым к тетродотоксину, яду рыбы фугу, который блокирует натриевые каналы (глава 3). Это изменение обусловлено повторным появлением тетродотоксин-резистентных натриевых каналов, которые являются превалирующей формой каналов в незрелой мышце[18]. В денервированной мышце происходят и другие изменения, такие как постепенная атрофия или опустошение мышечных волокон[19]–[21].

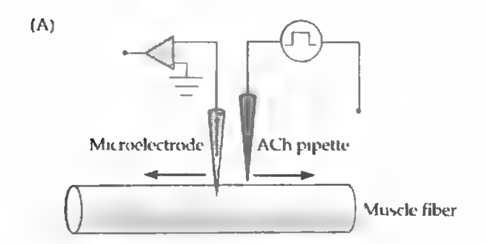
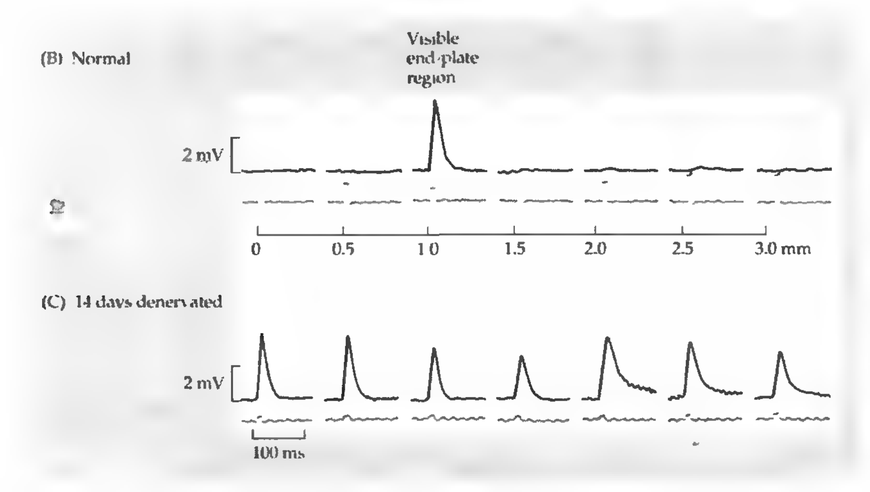


Рис. 24.3. После денервации в мышце кошки появляются новые АХ рецепторы. (А) Порции АХ наносятся из пипетки, заполненной АХ, на разные участки поверхности мышечного волокна, изменения мембранного потенциала при этом регистрируются внутриклеточным микроэлектродом. (В) В мышечном волокне с интактной иннервацией АХ вызывает ответ только вблизи концевой пластинки. (С) После 14 дней денервации мышечное волокно отвечает на АХ по всей своей длине.

Fig. 24.3. New ACh Receptors Appear after Denervation in cat muscle. (A) Pulses of ACh are applied from an ACh-filled pipette at different positions along the surface of a muscle fiber, while the membrane potential is recorded with an intracellular microelectrode. (B) In a muscle fiber with intact innervation, a response is seen only in the vicinity of the end plate. (C) After 14 days of denervation, a muscle fiber responds to ACh along its entire length. (After Axelsson and Thesleff, 1959.)



Появление новых АХ рецепторов после денервации или длительной инактивации мышцы

Гиперчувствительность к ацетилхолину объясняется повышением числа и изменением распределения АХ рецепторов в денервированной мышце. Этот факт был установлен в результате экспериментов, в которых записывали изменения мембранного потенциала мышечного волокна во время ионофоретической аппликации АХ из микропипетки на небольшие участки мышечной мембраны. В нормально иннервированной мышце лягушки, змеи или млекопитающего чувствительным к АХ был только участок концевой пластинки — там, где нервное волокно образует синапс. Остальная мышечная мембрана имела очень низкую чувствительность к медиатору. После денервации область, реагирующая на АХ, значительно увеличивалась, достигая практически равномерной чувствительности поверхности мышцы к АХ (рис. 24.3)[22]. У млекопитающих это занимало около недели; в мышце лягушки изменения были выражены меньше и развивались заметно дольше[23].

Рецепторы АХ, появляюшиеся во внесинаптических областях, не просто диффундируют от области исходной концевой пластинки. Этот факт впервые был установлен в экспериментах Катца и Миледи, в которых мышца лягушки была разрезана на две части. Содержащие ядра фрагменты мышцы, физически отделенные от исходной концевой пластинки, не только выживали, но и развивали повышенную чувствительность к АХ[24]. Главный вывод, который следует из этих экспериментов, заключается в том, что новые АХ рецепторы способны синтезироваться в экстрасинаптических участках денервированных мышц.

Синтез и деградация рецепторов в денервированной мышце

Ценным методом для изучения распределения и реорганизации АХ рецепторов является их мечение радиоактивным α-бунгаротоксином, который прочно и с высокой специфичностью связывается с АХ рецепторами. Мечение нормальной и денервированной мышц α-бунгаротоксином подтвердило, что число и распределение центров связывания токсина изменяется после денервации[25, 26]. В постсинаптической мембране нормальной мышцы определяется около 10^4 сайтов связывания токсина на мкм^2, в сравнении с менее чем 10/мкм^2 во внесинаптической области. После денервации число АХ рецепторов во внесинаптических участках возрастает до 10^3/мкм^2, тогда как в синаптической зоне плотность центров связывания α-бунгаротоксина меняется незначительно.

Рост числа АХ рецепторов в денервированной мышце может быть обусловлен их усиленным синтезом[25, 27]. Действительно, скорость появления новых рецепторов заметно повышается после денервации, и вещества, блокирующие синтез белка (такие как актиномицин или пуромицин), предупреждают этот эффект. Нозерн блоттинг и гибридизация *in situ* показывают, что в нормальной мышце мРНК для субъединиц АХ рецептора синтезируют только несколько ядер, локализующихся в непосредственной близи от концевой пластинки. В противоположность этому, при денервации гены АХ рецептора активируются по всей протяженности мышечного волокна (рис. 24.4)[28)—30].

Денервация оказывает также влияние на композицию субъединиц и скорость деградации АХ рецепторов. Во взрослой мышце синаптические и экстрасинаптические АХ рецепторы содержат ϵ-субъединицу с периодом полураспада около 10 дней[31, 32]. После денервации период полураспада рецепторов, содержащих ϵ-субъединицу и сохраняющихся в области концевой пластинки, уменьшается до 3 дней. Оборот рецепторов может быть вновь замедлен реиннервацией или повышением концентрации внутриклеточного цАМФ и последующей активацией протеинкиназы А[33].

Новые рецепторы, синтезированные в денервированной мышце (синаптические или внесинаптические), похожи на эмбриональные. Они содержат γ-субъединицу и имеют оборот с периодом полураспада 1 день[34, 35]. Эта скорость оборота АХ рецепторов может быть снижена экзогенным АТФ, действующим через пуринергические рецепторы[36].

Роль инактивации мышцы в денервационной гиперчувствительности

Каким образом перерезка двигательного нерва приводит к появлению новых АХ рецепторов — через инактивацию мышцы или через какие-то другие механизмы? Для исследования этой проблемы Ломо и Розенталь[37] блокировали проведение импульсов по двигательному нерву крысы аппликацией местного анестетика или дифтерийного токсина. Вещества апплицировались с помощью манжеты, наложенной на участок нерва на некотором расстоянии от мышцы. Этот метод приводил к эффективной инактивации мышцы, так как двигательные импульсы не проводились дальше манжеты. Тестовая стимуляция нерва дистальнее блокированного участка приводила к обычному сокращению мышцы. Кроме того, происходила нормальная генерация миниатюрных потенциалов концевой пластинки, свидетельствуя, что синаптическая передача была интактна. После 7 дней блока нерва мышца становилась гиперчувствительной (рис. 24.5). Другими экспериментами было показано, что новые внесинаптические рецепторы появляются тогда, когда нервно-мышечная передача блокирована долговременной аппликацией кураре или α-бунгаротоксина[38]. Эти результаты показали, что денервационная гиперчувствительность связана с потерей синаптической активации мышцы[39].

Важность мышечной активности как фактора, контролирующего реакцию мышцы на АХ, была подтверждена в экспериментах, в которых гиперчувствительные денервированные мышцы крысы прямо стимулировали через имплантированные электроды. Повторяющаяся в течение нескольких дней стимуляция мышц сокращала область, чувствительную к АХ, до уровня исходного синаптического участка (рис. 24.4D и 24.6)[37]. Спонтанная сократительная активность мышцы в этих условиях была слишком низкой для того, чтобы обратить эффекты денервации на распределение АХ рецепторов[25, 40].

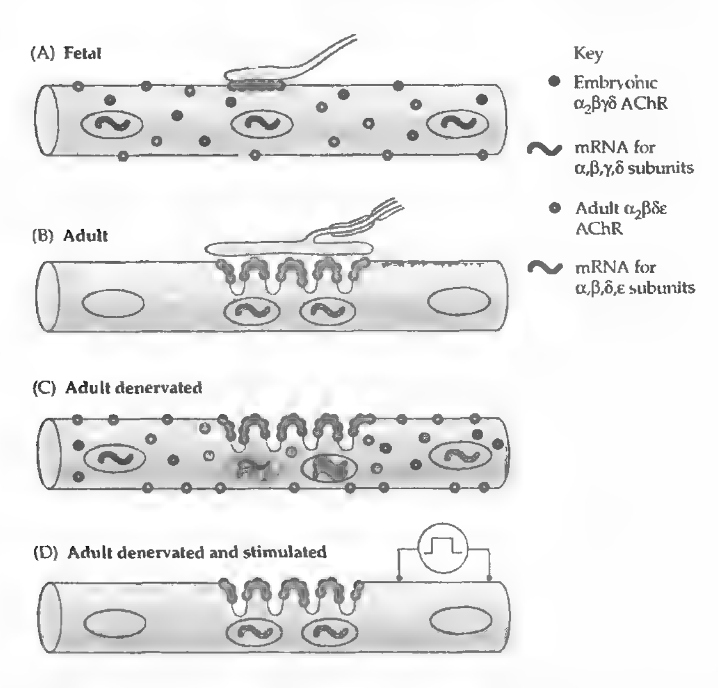


Рис. 24.4. Синтез и распределение АХ рецепторов в мышце крысы. (А) В эмбриональных мышцах мРНК для α, β, γ и δ-субъединиц АХ рецептора экспрессируется в ядрах по всей протяженности мышечного волокна. Эмбриональная $\alpha_2\beta\gamma\delta$ форма рецептора определяется по всей поверхности мышечного волокна и аккумулируется в зоне иннервации. (В) Во взрослых мышцах мРНК для α, β, δ и ε-субъединиц экспрессируется только в ядрах, располагающихся непосредственно под концевой пластинкой. Взрослая $\alpha_2\beta\delta\varepsilon$ форма рецептора локализована строго на гребнях синаптических складок. (С) В денервированных взрослых мышцах ядра непосредственно под концевой пластинкой экспрессируют α, β, γ, δ и ε-субъединицы; все другие ядра экспрессируют эмбриональную форму α, β, γ и δ-субъединиц. Эмбриональные АХ рецепторы найдены на всей поверхности мышечных волокон (обеспечивая таким образом денервационную гиперчувствительность), включая постсинаптическую мембрану; взрослая форма рецептора ограничена участком концевой пластинки. (D) При прямой стимуляции денервированных мышц паттерн экспрессии АХ рецептора напоминает таковой в иннервированном мышечном волокне.

Fig. 24.4. Synthesis and Distribution of ACh Receptors in rat muscle. (A) In fetal muscles, mRNAs for the α, β, γ and δ subunits of the ACh receptor (AChR) are expressed in nuclei all along the length of the myofiber. The embryonic $\alpha_2\beta\gamma\delta$ form of the receptor is found over the entire surface of the myofiber and accumulates at the site of innervation. (B) In adult muscles, mRNAs for the α, β, δ and ε subunits are expressed only in nuclei directly beneath the end plate. The adult $\alpha_2\beta\delta\varepsilon$ form of the receptor is highly localized to the crests of the junctional folds. (C) In denervated adult muscles, nuclei directly beneath the end plate express α, β, γ, δ and ε subunits; all other nuclei reexpress the fetal pattern of α, β, γ, and δ subunits. Embryonic ACh receptors are found all over the surface of the myofiber (producing denervation supersensitivity), including the postsynaptic membrane; the adult form of the receptor is restricted to the end-plate region. (D) If denervated muscles are stimulated directly, the pattern of ACh receptor expression resembles that in innervated myofibers. (After Witzemann, Brenner, and Sakmann, 1991.)

Роль ионов кальция в развитии гиперчувствительности в денервированной мышце

Каким же образом недостаток мышечной активности приводит к развитию гиперчувствительности? Считается, что ключевым фактором здесь выступает изменение концентрации внутриклеточного кальция (рис. 24.7)[41]. Электрическая активность иннервированной мышцы сопровождается притоком ионов кальция через потенциал-активируемые кальциевые каналы клеточной мембраны. Возросшая концентрация внутриклеточного кальция активирует протеинкиназу С, которая, в свою очередь, фосфорилирует и ингибирует миоген. Миоген является фактором транскрипции, который индуцирует экспрессию генов субъединиц АХ рецептора, а также регулирует ряд других процессов дифференцировки мышцы. Таким образом, в иннервированной мышце приток ионов кальция ингибирует экспрессию генов, контролирующих синтез АХ рецептора, сохраняя общую экспрессию АХ рецепторов на низком уровне. Дополнительные сигналы, которые специфически индуцируют экспрессию АХ рецепторов в ограниченном числе мышечных ядер, располагающихся непосредственно под постсинаптической мембраной, обсуждаются в следующем разделе. В инактивированной (денервированной) мышце приток ионов кальция являет-

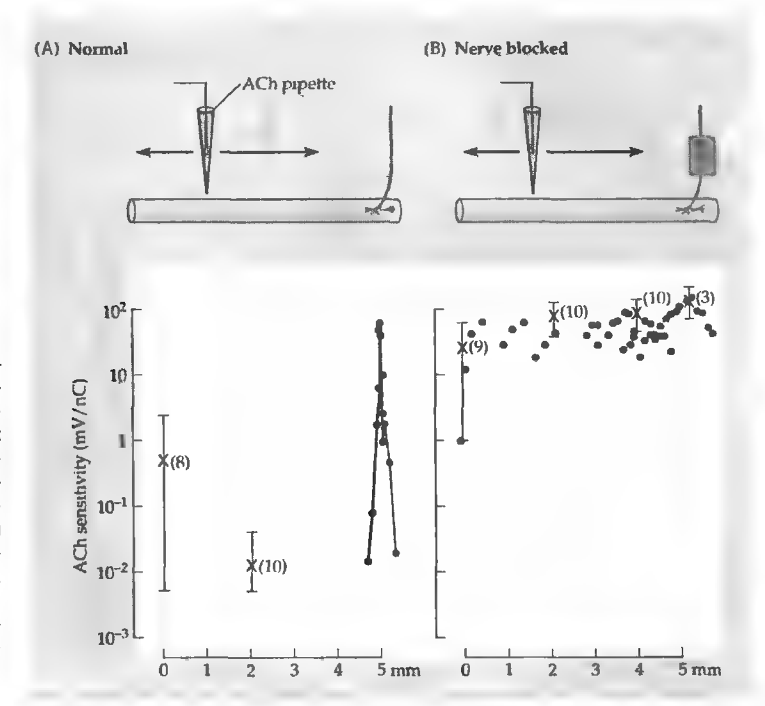


Рис. 24.5. В мышце крысы блокирование нервной проводимости приводит к появлению новых АХ рецепторов. (А) В нормальной мышце чувствительность к АХ ограничена участком концевой пластинки. (В) После блокады двигательного нерва в течение 7 дней местным анестетиком чувствительность к АХ распространяется по всей поверхности мышечного волокна.

Fig. 24.5. New ACh Receptors appear after block of nerve conduction in rat muscle. (A) In the normal muscle, ACh sensitivity is restricted to the end-plate region (near the 5 mm position). (B) After the nerve to the muscle was blocked for 7 days by a local anesthetic, the ACh sensitivity is distributed over the entire muscle fiber surface. Sensitivity is expressed numerically in millivolts of depolarization per nanocoulomb of charge ejected from the pipette (Chapter 9). The crosses and bars represent the mean and range of sensitivities of a number (in parentheses) of adjacent muscle fibers. (From Lømo and Rosenthal, 1972.)

ся сниженным, что устраняет ингибирование и приводит к повышению экспрессии АХ рецепторов.

Изменение времени полураспада АХ рецептора, происходящее в денервированной мышце, также является результатом снижения мышечной активности[42]. Скорость деградации рецептора возрастает как в мышцах, парализованных денервацией, так и в тех, которые обездвижены продолжительной аппликацией тетродотоксина. Наоборот, прямая электрическая стимуляция денервированной мышцы восстанавливает число АХ рецепторов в синаптических зонах до исходного нормального уровня. И в этом процессе вход ионов кальция в мышечное волокно через потенциал-активируемые кальциевые каналы играет важную роль[43]. Снижение скорости деградации АХ рецепторов, индуцированное мышечной активностью, воспроизводится обработкой инактивированных мышц кальциевым ионофором А23187. Напротив, стабилизация АХ рецептора в мембране предупреждается блокаторами кальциевых каналов. Повышение концентрации внутриклеточного цАМФ также замедляет деградацию рецепторов в инактивированных мышцах. Последний факт свидетельствует о том, что приток ионов кальция в мышечное волокно вызывает стабилизацию рецептора через активацию аденилатциклазы и последующие процессы фосфорилирования белка[44, 45].

Нервные факторы регуляции синтеза АХ рецептора

Мышечная активность является не единственным фактором, поддерживающим нормальное число и композицию рецепторов в скелетных мышцах. Об этом свидетельствуют эксперименты по частичной денервации мышцы, в которых медленно развивающиеся денервационные изменения наблюдались, несмотря на сохранение мышечной активности. Сделать это заключение помогло то, что волокна

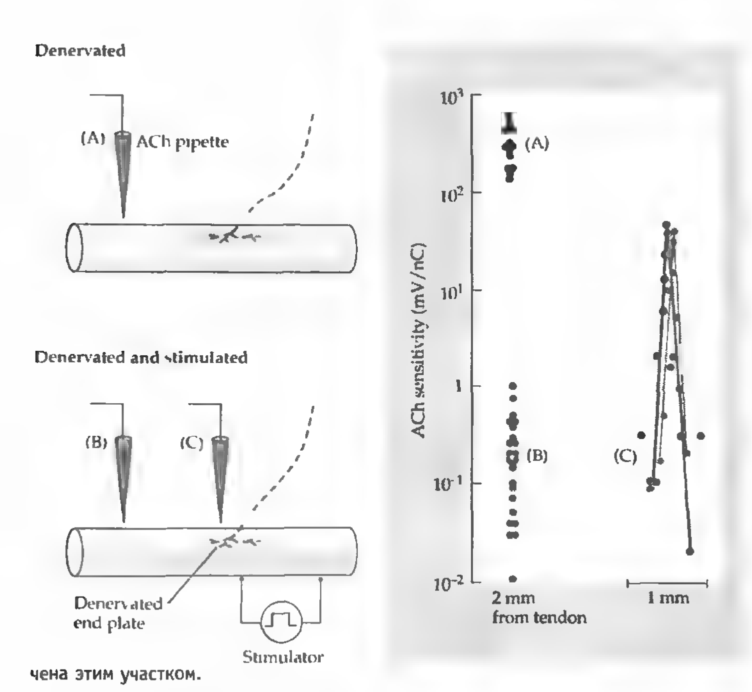


Рис. 24.6. Устранение гиперчувствительности в денервированной мышце крысы прямой стимуляцией мышечных волокон. (A) Увеличение чувствительности во внесинаптической части мышечного волокна после 14 дней денервации. (B) Чувствительность внесинаптического участка денервированной мышцы, сохранявшейся в течение 7 дней без стимуляции, а затем стимулированной с перерывами в последующие 7 дней. Эта процедура устраняла денервационную гиперчувствительность. (C) Чувствительность к АХ двух стимулированных волокон той же мышцы рядом с денервированными участками концевой пластинки. В стимулированной мышце высокая чувствительность к АХ ограничена этим участком.

Fig. 24.6. Reversal of Supersensitivity in a denervated rat muscle by direct stimulation of the muscle fibers. (A) Increased sensitivity in the extrasynaptic portion of a muscle fiber after 14 days of denervation. (B) Sensitivity in the extrasynaptic region of a muscle that had been denervated for 7 days without stimulation, and then stimulated intermittently for another 7 days. This treatment reversed the denervation supersensitivity. (C) ACh sensitivity in two stimulated fibers of the same muscle near their denervated end-plate regions. The high sensitivity is confined to this region in the stimulated muscle. (After Lømo and Rosenthal, 1972.)

длинной портняжной мышцы лягушки иннервируются более чем одним синапсом. Если эта мышца частично денервировалась перерезкой внутримышечных разветвлений нерва, в денервированных участках развивалась типичная гиперчувствительность мышечных волокон к АХ. Однако в целом эти мышечные волокна были активными и сохраняли сократимость по всей длине[23]. Гибридизация *in situ* в интактной, денервированной и парализованной токсином мышцах крысы показала, что распределение мРНК, кодирующей синтез АХ рецепторов, независимо от мышечной активности, зависит, по крайней мере, от двух нервных факторов. Один из этих факторов стимулирует экспрессию взрослой ε-субъединицы в ядрах, примыкающих к концевой пластинке, а другой фактор угнетает экспрессию γ-субъединицы и подавляет образование мРНК для других субъединиц[39].

Одним из нервных факторов, регулирующих экспрессию АХ рецептора, является АРИА (ацетилхолиновый рецептор, индуцирующий активность), который был исходно выделен из мозга цыпленка[41, 46]. АРИА синтезируется и секретируется мотонейронами и стимулирует экспрессию всех пяти субъединиц АХ рецептора, и среди них наиболее заметно — синтез ε-субъединицы (рис. 24.7)[47]. АРИА принадлежит к семейству белков, называемых нейрорегулинами. Рецепторы для нейрорегулинов относятся к семейству рецепторов тирозинкиназ, родственных с рецептором I типа для эпидермального фактора роста. Установлено, что несколько субъединиц этого рецептора (erbB2, erbB3 и erbB4) аккумулируется в нервно-мышечном соединении. Стимуляция erbB рецепторов в мышце активирует два внутриклеточных сигнальных каскада, таких как киназу Ras/митоген-активирующего белка (Ras/MAP) и фосфатидилинозитол 3-киназу (PI-киназа), вызывая, таким образом, усиление экспрессии гена АХ рецептора[48)—50].

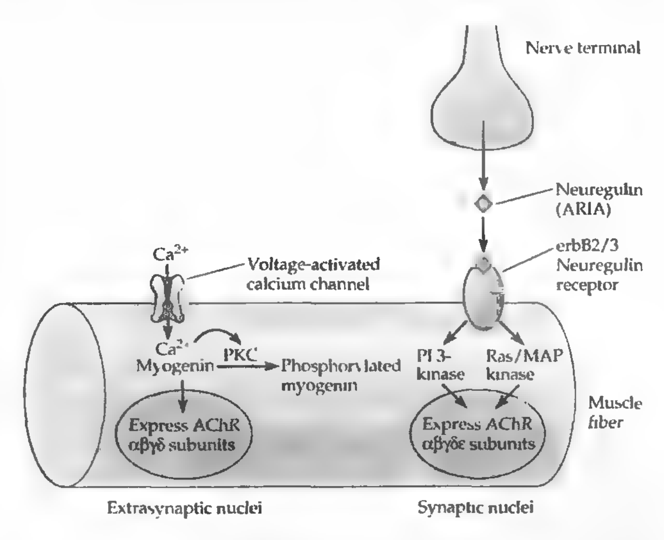


Рис. 24.7. Контроль синтеза АХ рецепторов ионами кальция и нейрональными факторами. Во внесинаптической части скелетного мышечного волокна позвоночного вход ионов кальция через потенциал-активируемые кальциевые каналы активирует протеинкиназу C (PKC), которая фосфорилирует и инактивирует миогенин. В синапсе нейрорегулин ARIA освобождается из нервных окончаний и взаимодействует с erbB2/3 рецепторами. Это активирует фосфатидилинозитол 3-киназу (PI 3-киназа) и Ras/митоген-активирующую протеинкиназу (Ras/MAP), что ведет к экспрессии α, β, γ, δ и ε-субъединиц АХ рецептора. Другие нейрональные сигналы подавляют экспрессию γ-субъединицы.

Fig. 24.7. Control of ACh Receptor Synthesis by Calcium and Neural Factors. In extrasynaptic regions of a vertebrate skeletal muscle fiber, influx of calcium through voltage-activated calcium channels activates protein kinase C (PKC), which phosphorylates and inactivates myogenin. At the synapse, the neuregulin ARIA is released from nerve terminals and interacts with erbB2/3 receptors. This activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) and Ras/mitogen-activated protein (Ras/MAP) kinase pathways, leading to expression of AChR α, β, γ, δ and ε subunits. Other neural signals suppress expression of the γ subunit.

Распределение рецепторов в нервных клетках после денервации

Эффект денервации на распределение рецепторов в нейронах изучался на автономном ганглии лягушки и цыпленка. В живом сердце лягушки парасимпатические нейроны можно увидеть в прозрачной межпредсердной перегородке, что значительно облегчает аппликацию АХ на отдельные участки клеточной поверхности. Кроме того, клетки не имеют дендритов; синапсы формируются прямо на клеточной соме (рис. 24.8A). Подобно волокнам скелетной мышцы, эти нейроны чувствительны к АХ на участках, располагающихся под пресинаптическими окончаниями[51]. При оценке распределения АХ рецепторов иммунофлуоресцентной микроскопией было обнаружено, что клетки ганглия имеют приблизительно 30 крупных плотно упакованных кластеров АХ рецепторов, локализующихся в синаптических зонах, и более 100 маленьких внесинаптических кластеров, рассеянных по всей поверхности клетки (рис. 24.8B). Примерно 20 % рецепторов находились во внесинаптических зонах[53].

Для изучения эффектов денервации на сердце лягушки перерезали оба блуждающих нерва[54, 55]. Синаптическая передача между окончаниями блуждающего нерва и клетками ганглия нарушалась уже на второй день после денервации. Параллельно с этим увеличивалась поверхность нейрона, чувствительная к АХ. Через 4–5 дней после денервации аппликация АХ в любой точке клеточной поверхности вызывала деполяризацию мембраны. В других отношениях клетки выглядели неизмененными. Полученный результат был, по-видимому, не следствием изменения числа АХ рецепторов, а скорее был связан с их перераспределением (рис. 24.8C и D)[52, 56]. Денервация сокращала количество синаптических кластеров на 90 % и вызывала увеличение в 2–3 раза числа малых внесинаптических кластеров, распределенных по всей клеточной поверхности. Денервация приводила также к снижению уровня ацетилхолинэстеразы[57]. Таким образом, чувствительность к АХ повышалась. Если условия способствовали регенерации исходного нерва, чувствительная к АХ зона вновь ограничивалась синаптическими зонами[55].

В других ганглиях цыпленка и лягушки денервация либо имела меньший эффект, либо не оказывала влияния на распределение АХ рецепторов на клеточной поверхности[58)–61]. Например, денервация не меняла чувстви-

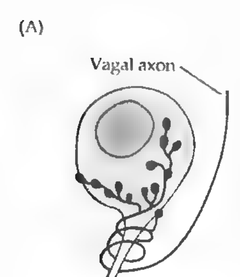
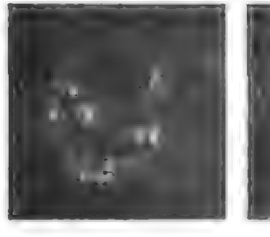


Рис. 24.8. (Рис. 24.8В см. на цветной вклейке после с. 640.) Развитие гиперчувствительности в парасимпатических нервных клетках сердца лягушки после денервации. (A) Парасимпатические ганглионарные клетки иннервированы аксонами блуждающего нерва, которые формируют конечные синаптические бутоны, диффузно представленные по всей клеточной поверхности. (B) Парная иммунофлуоресцентная микрография клетки ганглия нормального животного, помеченная антителами к АХ рецептору и к синаптическим везикулам. В синаптических зонах расположены крупные плотно-упакованные кластеры АХ рецепторов; более ста малых кластеров распределены по внесинаптической поверхности. (C, D) Изображение ложно-оперированных (C) и денервированных (D) ганглионарных клеток, помеченных антителами к АХ рецептору. Денервация вызывает снижение числа синаптических кластеров и значительный рост небольших внесинаптических кластеров, что приводит к развитию гиперчувствительности.



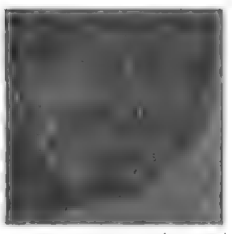


Fig. 24.8. Development of Supersensitivity in parasympathetic nerve cells in frog heart after denervation. (A) Parasympathetic gangion cells are innervated by axons in the vagus nerve, which form terminal boutons scattered over the cell surface. (B) Stereo-pair immuno-fluorescence micrographs of a ganglion cell in a normal animal, labeled with antibodies to AChRs and to synaptic vesicles. Large, dense clusters of AChRs are located at synaptic sites; more than a hundred small extrasynaptic clusters are spread over the rest of the cell surface. (C, D) Images of sham-operated (C) and 20-day denervated (D) ganglion cells labeled with antibodies to AChRs. Denervation causes a decrease in the number of synaptic clusters and a marked increase in small extrasynaptic clusters, producing supersensitivity. (From Wilson Horch and Sargent, 1996; micrographs kindly provided by P. B. Sargent.)

тельность нейронов симпатического ганглия лягушки к *ионофоретически* приложенному АХ. Однако, если чувствительность к АХ измерялась в условиях введения его через *омывающий раствор*, наблюдалось 18-кратное повышение чувствительности. Это различие, по-видимому, было обусловлено снижением активности ацетилхолинэстеразы, ассоциированной с преганглиальными аксонами, которая в интактных условиях предотвращает проникновение АХ к нейронам, располагающимся внутри ганглия. Таким образом, эффекты денервации на распределение рецепторов для нейротрансмиттеров различны в нервных и мышечных клетках. Более того, они различаются и в зависимости от типа нейронов.

Восприимчивость нормальной и денервированной мышцы к новой иннервации

У взрослого млекопитающего и лягушки иннервированные мышечные волокна не допускают иннервации дополнительным нервом[62]. Так, если приложить перерезанный конец двигательного нерва к иннервированной мышце, в ней не будут формироваться ни новые разветвления, ни дополнительные концевые пластинки. Наоборот, из того же нерва образуются нервные разветвления и происходит реиннервация, если он приложен к денервированной или поврежденной мышце. В отличие от ситуации во время развития нервно-мышечной системы, когда растущие конусы нерва контактируют с мышечными волокнами беспорядочно, реиннервация обычно происходит в зоне исходной концевой пластинки. Регенерированные аксоны направляются к исходным синаптическим зонам по эндоневрию предшествующего аксона (рис. 24.1) и тянутся отростками к шванновским клеткам, которые покрывали терминали прежнего аксона (глава 8)[63]. Тем не менее, если перерезанный нерв находится далеко от исходной концевой пластинки или есть факторы, препятствующие росту аксона, то может образоваться новая концевая пластинка. Это значит, что нервные волокна могут расти во взрослом мышечном волокне и образовывать синапсы в участке, который никогда не был иннервирован, с последующим формированием пре- и постсинаптических специализированных структур.

Гиперчувствительность и формирование синапса

При каких условиях денервированная мышца не отторгает нерв? После того как мышцы крысы стали гиперчувствительными в результате блокирования проведения импульсов в нерве или вследствие аппликации ботулинового токсина, чужие нервы могут образовывать дополнительные синапсы[62, 64, 65]. После устранения блока каждый из двух нервов может продуцировать синаптические потенциалы и вызывать мышечные сокращения. Наоборот, если денервированная мышца подвергается прямой стимуляции, ее способность воспринимать дополнительную иннервацию теряется вместе с ее гиперчувствительностью.

Является ли гиперчувствительность мышцы необходимой предпосылкой для возникновения иннервации? Как описывалось в главе 23, к моменту иннервации мышечные волокна эмбрионов и новорожденных крыс чувствительны к АХ по всей своей поверхности[66]. Аналогично, мышечные волокна, растущие в клеточной культуре, чувствительны к АХ и поддаются иннервации по всей своей протяженности[67]. Таким образом, оба феномена, как начальная иннервация, так и реиннервация, происходят тогда, когда мышечные волокна являются гиперчувствительными к медиатору. Тем не менее формирование синапса не зависит напрямую от функции АХ рецептора. В денервированных мышцах крысы и *Xenopus* реиннервация происходит и тогда, когда АХ рецепторы блокированы α-бунгаротоксином или кураре[68, 69]. Одним из факторов, обеспечивающих восприимчивость мышцы к иннервации, является MuSK, рецептор тирозинкиназы, через который агрин запускает дифференцировку постсинаптического аппарата (глава 23)[70].

Аксональный рост, индуцированный денервацией

Денервированные мышцы не только поддаются иннервации, но они активно побуждают неповрежденные нервы отращивать новые разветвления (вызывают спраутинг). Например, если мышца частично денервирована, оставшиеся терминали аксонов будут расти и иннервировать денервированные мышечные волокна (рис. 24.9)[71]. Так же как регуляция синтеза и деградации АХ рецептора, запускающим фактором для роста аксонов является отсутствие мышечной активности. Спраутинг и гипериннервация происходят тогда, когда мышечная активность устранена блокированием потенциалов действия нерва тетродотоксином[72] или если нервно-мышечная передача блокирована ботулиновым токсином или α-бунгаротоксином[73, 74]. Кроме того, важную роль в регуляции роста конечных разветвлений аксона играют шванновские клетки, покрывающие нервные терминали (глава 8)[75].

Молекулярные механизмы, вызывающие рост терминалей аксонов, еще не изучены в достаточных деталях. Однако ясно, что сигналы, контролирующие этот процесс, являются высокоспецифическими. В коже пиявки, например, разрушение отдельных чувствительных или двигательных нейронов с помощью проназы вызывает рост аксонов в денервированную зону, но не любых, а только аксонов клеток той же модальности[76)–78]. Привлекательным выглядит использование в будущем методов молекулярной биологии для идентификации в одиночных нейронах пиявки генов, специфически регулирующих эти процессы[79].

Подобным же образом, когда клетки зубчатой фасции гиппокампа крысы избирательно денервированы удалением с ипсилатеральной стороны энторинальной коры, три оставшихся входа к этим клеткам растут и образуют новые синапсы совершенно определенным и точным образом (рис. 24.10)[80]. Аксоны противоположной стороны коры головного мозга, которые обычно обеспечивают только редкие единичные входы, растут очень экстенсивно и замещают как структурно, так и функционально ипсилатеральный энторинальный вход, который до этого обеспечивал 80 % синаптических контактов. Среди реагирующих на повреждение волокон есть входы от медиальной перегородки; их спраутинг запускается повышением продукции NGF в поврежденном участке.

§ 3. Регенерация периферической нервной системы позвоночных

Восстановление поврежденных аксонов

Шванновские клетки периферической нервной системы обеспечивают окружение, способствующее регенерации аксона. Стимули-

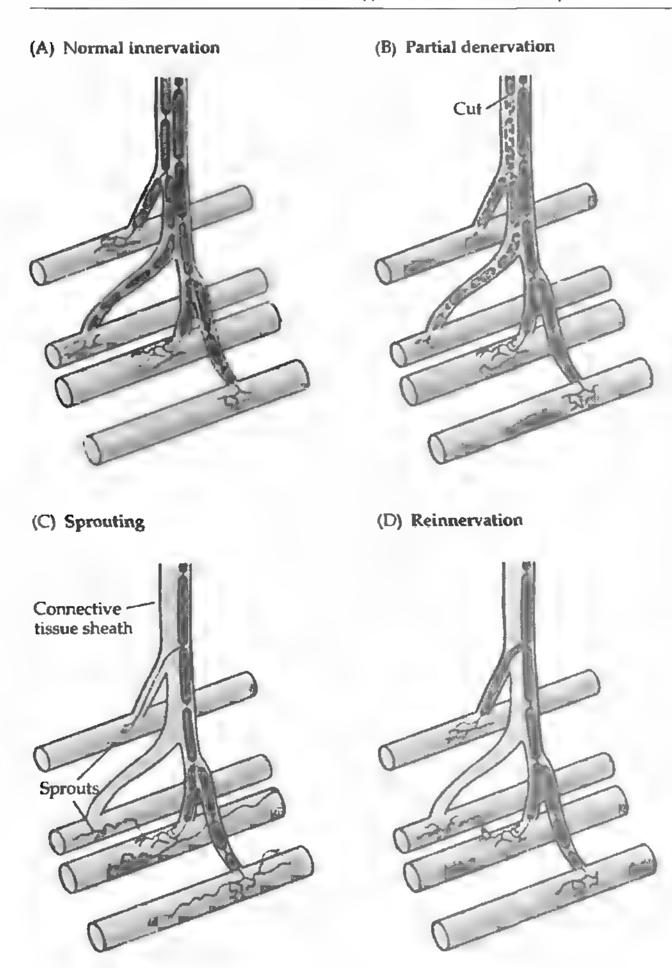


Рис. 24.9. Рост нервных окончаний в ответ на частичную денервацию скелетной мышцы млекопитающего. (А) Обычная модель иннервации. (В) Часть волокон денервирована перерезкой нескольких аксонов, иннервирующих мышцу. (С) Аксоны отрастают от терминалей и узлов вдоль претерминальных аксонов неповрежденных мотонейронов, чтобы иннервировать денервированные волокна. (D) После 1 или 2 месяцев отростки, которые контактировали с вакантными концевыми пластинками, сохраняются, в то время как другие отростки исчезают.

Fig. 24.9. Nerve Terminals Sprout in Response to Partial Denervation of a mammalian skeletal muscle. (A) Normal pattern of innervation. (B) Some fibers are denervated by cutting a few of the axons innervating the muscle. (C) Axons sprout from the terminals and from nodes along the preterminal axons of undamaged motoneurons to innervate the denervated fibers. (D) After 1 or 2 months, sprouts that have contacted vacant end plates are retained, while other sprouts disappear. (After Brown, Holland, and Hopkins, 1981.)

рующая рост нейронов активность шванновских клеток является следствием секреции многих трофических факторов, экспрессии на поверхности клеток молекул адгезии и интегринов, а также продукции компонентов внеклеточного матрикса, таких как ламинин[81]. Например, эксперименты, в которых повреждался седалищный нерв, показали, что в то время, как периферический участок аксона дегенерирует, уцелевшие шванновские клетки в этой области синтезируют в высоких концентрациях два нейротрофических фактора: BDNF (нейротрофический фактор, полученный из мозга) и NGF (рис. 24.11)[82, 83]. Таким образом, шванновские клетки могут снабжать трофическими факторами BDNF и NGF двигательные, чувствительные и симпатические аксоны, регенерирующие к своим периферическим мишеням. Интересно, что такие «денервированные» шванновские клетки экспрессируют на своей поверхности большое число низкоаффинных рецепторов для NGF и BDNF. Возможно, это поддерживает некоторую тоническую концентрацию этих нейротрофинов, которые служат для выбора правильного направлении для роста регенерирующих аксонов[84]. После регенерации нервов шванновские клетки прекращают продукцию NGF и BDNF и вновь обеспечивают изоляцию аксонов.

Аполипопротеин Е (АроЕ), синтезируемый шванновскими клетками и макрофагами, также накапливается в дистальном участке поврежденных периферических нервов и связывается с базальной мембраной шванновских клеток (см. рис. 24.11)[85, 86]. АроЕ поддержи-

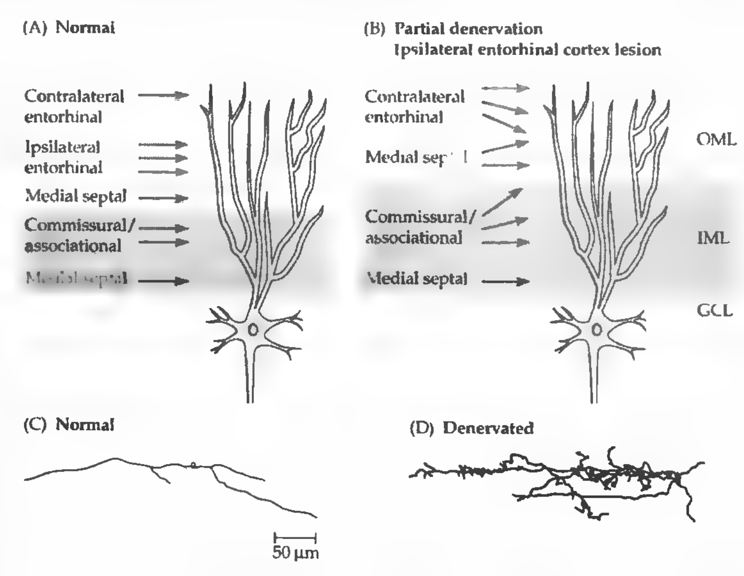


Рис. 24.10. Спраутинг аксонов в ЦНС млекопитающих. (A) Типичная гранулярная клетка зубчатой фасции на ее дендритах во внешнем молекулярном слое (OML) получает множественные синаптические входы от ипсилатеральной энторинальной коры головного мозга и единичные входы от контралатеральной коры и медиальной перегородки. Дендриты внутреннего молекулярного слоя (IML) получают входы от медиальной перегородки и коммиссуральных/ассоциативных волокон. GCL = гранулярный клеточный слой. (B) Удаление ипсилатеральной энторинальной коры приводит к интенсивному росту аксонов нервных клеток энторинальной коры с контралатеральной стороны и замещению ипсилатерального энторинального входа в OML. Наблюдается также спраутинг аксонов, приходящих в OML от медиальной перегородки. Коммиссуральные/ассоциативные волокна в IML расширяют зону иннервации. (C, D) Примеры терминальных разветвлений аксонов от контралатеральной энторинальной коры в OML зубчатой фасции. (C) Норма. (D) Два месяца спустя после повреждения ипсилатеральной энторинальной коры.

Fig. 24.10. Sprouting of Axons in the Mammalian CNS. (A) A typical granule cell in the dentate gyrus receives dense synaptic input from the ipsilateral entorhinal cortex, and sparse input from the contralateral cortex and medial septum on its dendrites in the outer molecular layer (OML). Dendrites in the inner molecular layer (IML) receive medial septal and commissural/associational inputs. GCL = granule cell layer. (B) Following ablation of the ipsilateral entorhinal cortex, axons from the contralateral entorhinal cortex sprout extensively and replace the ipsilateral entorhinal input in the OML. There is also some sprouting of axons from the medial septum in the OML. Commissural/associational fibers in the IML expand their termination zone. (C, D) Examples of terminal arbors of axons from the contralateral entorhinal cortex in the OML of the dentate gyrus. (C) Normal. (D) Two months after lesion of the ipsilateral entorhinal cortex. (After Deller and Frotscher, 1997.)

вает жизнеспособность нейронов за счет защиты клеток от окислительного повреждения, а также стимуляции роста и адгезии клеток. Тем не менее у нокаутных мышей, лишенных ApoE, регенерация и ремиелинизация периферических аксонов существенно не меняется[87]. Однако мыши с отсутствием ApoE имеют сниженное число немиелинизированных аксонов и, соответственно, сниженную чувствительность к повреждающим тепловым стимулам[86].

При повреждении периферического нерва в зоне повреждения активируются факторы, стимулирующие пролиферацию шванновских клеток. Они включают два цитокина: фактор, ингибирующий лейкемию (ФИЛ)[88], и Reg-2, являющийся потенциальным митогеном шванновских клеток (см. рис. 24.11)[89]. Reg-2 специфически экспрессируется в развивающихся и регенерирующих двигательных и чувствительных нейронах, и эта экспрессия усиливается ФИЛ. Антитела к Reg-2 замедляют регенерацию после передавливания седалищного нерва.

Специфичность реиннервации

Для полного восстановления функции после повреждения нервной системы регенерирующие аксоны должны восстановить связи со своими прежними мишенями. Классические эксперименты Лэнгли, подтвержденные позже исследованиями одиночных клеток, показали, что регенерирующие преганглионарные аксоны нейронов автономной нервной системы реиннервируют соответствующие постганглионарные нейроны[2]. В этом

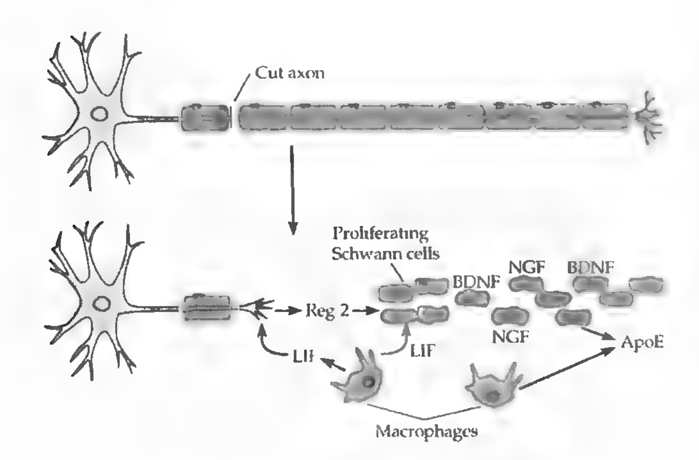


Рис. 24.11. Шванновские клетки способствуют регенерации аксонов в периферической нервной системе позвоночных. После аксотомии дистальный участок аксона и миелиновая оболочка дегенерируют и фагоцитируются. Пролиферация шванновских клеток стимулируется двумя цитокинами: фактором, ингибирующим лейкемию (LIF), из макрофагов и Reg-2 из окончаний аксонов. Экспрессия Reg-2 усиливается LIF. Пролиферирующие шванновские клетки синтезируют два нейротрофических фактора, BDNF и NGF, которые сохраняются на клеточной поверхности их низкоаффинными рецепторами. Нейротрофины поддерживают процесс регенерации аксонов и направляют их к соответствующим мишеням. Шванновские клетки и макрофаги синтезируют также аполипопротеин E (ApoE), который способствует выживанию нейронов и регенерации их аксонов.

Fig. 24.11. Schwann Cells Promote Axon Regrowth in the vertebrate peripheral nervous system. After axotomy, the distal portion of the axon and the myelin degenerate and are phagocytized. Schwann cell proliferation is stimulated by two cytokines: leukemia inhibitory factor (LIF) from macrophages and Reg-2 from axon terminals. Expression of Reg-2 is enhanced by LIF. Proliferating Schwann cells synthesize two neurotrophic factors, BDNF and NGF, which are held on the cell surface by low-affinity BDNF/NGF receptors and help sustain regenerating axons and guide them to their targets. Schwann cells and macrophages also synthesize apolipoprotein E (ApoE), which may help promote neuron survival and axon regrowth.

механизме имеет значение, по-видимому, сигнал о позиции нейрона, который оказывает влияние на формирование синапса между нейроном и клеткой-мишенью. Этот механизм справедлив как для симпатической, так и двигательной системы. Так, если межреберная мышца, извлеченная из передней части грудной клетки, трансплантируется в область шеи, то она преимущественно реиннервируется аксонами шейного симпатического ствола, расположенными в самых передних участках спинного мозга (рис. 24.12)[90]. Наоборот, мышцы, трансплантированные из задних областей тела, имеют тенденцию к реиннервации аксонами более дорзальных нейронов. Подобная тенденция установлена и для трансплантации симпатических ганглиев различного исходного расположения[91]. У молодых крыс зависимость от позиции нейрона показана в реиннервации мышц, имеющих множественную иннервацию несколькими сегментами[92].

Нервно-мышечные синапсы у новорожденных крыс, головастиков и взрослых тритонов после поперечного пересечения двигательного нерва с высокой точностью воссоединяются с исходной синаптической зоной[93]. Одним из механизмов избирательного восстановления синапсов является конкуренция между аксонами. В мышцах саламандры, иннервированных чужим аксоном, чужеродный синапс элиминируется после того, как нормальный нерв восстановил свой синаптический контакт[94]. У взрослых млекопитающих чувствительные, двигательные и постганглионарные аксоны показывают более низкую избирательность по отношению к их исходным мишеням. Чужие нервы при иннервации мышечных волокон могут быть столь же эффективными, как и оригинальные нервные волокна[93]. Более того, чужой нерв может даже вытеснить исходный аксон в интактных мышцах взрослой крысы[95]. Избирательная регенерация у взрослых млекопитающих возможна, если периферический нерв был не перерезан, а передавлен так, чтобы сохранились эндоневрий и базальная мембрана шванновских клеток, окружавших интактные аксоны (см. рис. 24.1)[93]. При таких условиях регенерирующие аксоны направляются вновь к своим исходным мишеням. Если эндоневрий был разрушен, например при перерезке нерва, регенерация происходит беспорядочно и аксоны часто создают синапсы с неподходящими мишенями.

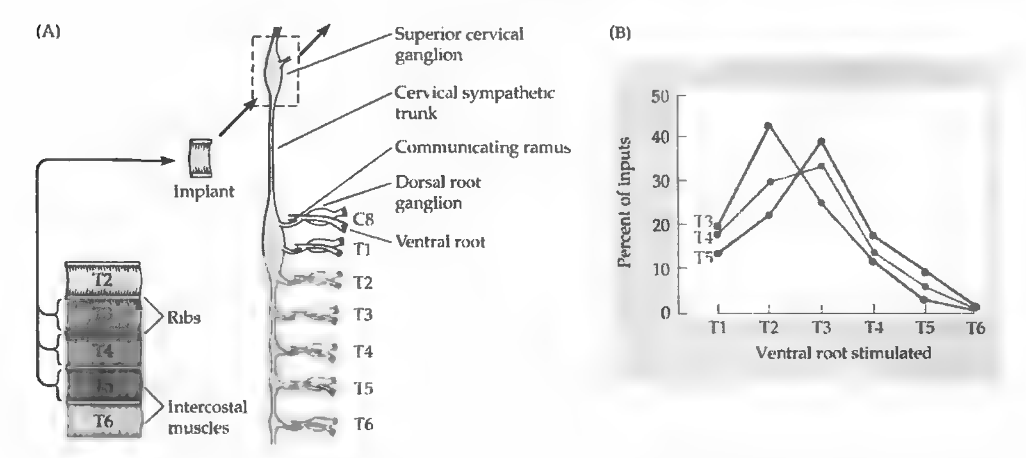


Рис. 24.12. Селективная реиннервация мышц, основанная на сегментарном происхождении. (А) Межреберная мышца из грудного сегмента T3, T4 или T5 была трансплантирована на шею взрослой крысы и после удаления верхнего шейного ганглия была реиннервирована преганглионарными аксонами шейного симпатического ствола. Сегментарное происхождение входов было определено регистрацией активности мышц при стимуляции отдельных вентральных корешков, которые соединяют преганглиальные аксоны с нервным стволом. (В) Распределение входов к трансплантированным T3, T4 и T5 мышцам. Передние мышцы склонны к реиннервации передними преганглиальными аксонами.

Fig. 24.12. Selective Reinnervation of Muscles Based on Segmental Origin. (A) An intercostal muscle from thoracic segment T3, T4, or T5 was transplanted to the neck of an adult rat and reinnervated by preganglionic autonomic axons in the cervical sympathetic trunk, after removal of the superior cervical ganglion. The segmental origin of the inputs was determined by recording from the muscle and stimulating individual ventral roots that supply preganglionic axons to the trunk. (B) Distribution of inputs to transplanted T3, T4, and T5 muscles. More anterior muscles tend to be innervated by more anterior preganglionic axons. (After Wigston and Sanes, 1985.)

Свойства нерва и мышцы после образования синапса чужим нервом

Первые наблюдения о последствиях формирования синапсов чужим нервом относятся к 1904 году, когда Лэнгли и Андерсон провели выдающееся исследование, показавшее, что мышцы кошки могут иннервироваться преганглионарными холинергическими симпатическими волокнами[96], которые в норме создают синапсы в автономном ганглии (глава 16). Было также показано формирование подобных синапсов между автономными нервами лягушки и скелетными мышцами крысы (рис. 24.12)[90, 97]. Многие свойства нерва и мышцы в таких экспериментах оставались без изменений, несмотря на необычную иннервацию.

В других экспериментах было показано, что свойства мышц с чужеродной иннервацией заметно изменяются. Ярким примером являются медленные скелетные мышечные волокна лягушки: они иннервированы диффузно, имеют характерные детали строения и не генерируют регенеративных потенциалов действия или быстрых мышечных сокращений[98]. После денервации медленные волокна могут быть реиннервированы нервами, которые в норме иннервируют быстрые мышцы. В этих условиях медленные волокна становятся способными генерировать потенциалы действия и осуществлять быстрое мышечное сокращение[99]. Экклс и коллеги после перерезки меняли местами нервы, иннервирующие два типа мышц котят и крыс, различающихся по скорости сокращения. Оба этих типа мышечных волокон генерируют распространяющиеся потенциалы действия и называются **медленно-** и **быстро-сокращающимися** волокнами, соответственно. После реиннервации чужим нервом медленно-сокращающиеся мышцы становились быстрее, а быстро-сокращающиеся — медленнее[100]. Главным фактором трансформации являлся паттерн импульсов в нерве и результирующие мышечные сокращения; мотонейроны, иннервирующие медленно- и быстро-сокращающиеся мышечные волокна, возбуждаются с различной частотой[101].

§ 4. Роль базальной мембраны в регенерации нервно-мышечных синапсов

Структурой, играющей ключевую роль в регенерации нервно-мышечных синапсов, является синаптическая базальная мембрана, которая находится между нервным окончанием и мышечной мембраной. Синаптическая базальная мембрана представляет собой интенсивно окрашиваемое внеклеточное вещество, состоящее из протеогликанов и гликопротеинов. Как показано на рис. 24.13A, базальная мембрана окружает мышцу, нервное окончание и шванновскую клетку и погружается в складки постсинаптической мембраны.

МакМахан и его коллеги провели серию элегантных исследований роли синаптической базальной мембраны в дифференцировке нерва и мышцы[102)–105)]. Успех их работы базировался на использовании очень удобной экспериментальной модели тонкой кожно-грудной мышцы лягушки, в которой положение концевых пластинок легко различимо в живой мышце. На первом этапе клетки в определенном участке мышцы локально разрушали либо перерезкой нерва и мышечных волокон, либо повторным приложением металлической пластины, охлажденной жидким азотом (рис. 24.13B). В течение нескольких дней часть мышечных волокон в участке повреждения дегенерировала вместе с нервными окончаниями и была фагоцитирована, но базальная мембрана оставалась при этом интактной (рис. 24.13C). Место исходного нервно-мышечного соединения могло быть легко распознано по характерной морфологии базальной мембраны мышцы и шванновских клеток, остающихся в зоне синапса, а также по наличию холинэстеразы, сохраняющейся на синаптической базальной мембране и в синаптических складках.

Через две недели после повреждения в зоне синаптической базальной мембраны формировались новые мышечные волокна, контактирующие с регенерирующими аксональными окончаниями. Стимуляция нервов вызывала сокращения вновь образованных мышечных волокон. Почти все регенерированные синапсы локализовались точно на исходных синаптических зонах, что выявлялось после окраски мышцы на присутствие холинэстеразы. Таким образом, был сделан вывод о наличии сигналов, ассоциированных с синаптической базальной мембраной, которые определяют успех регенерации синапсов.

Синаптическая базальная мембрана и формирование синаптической специализации

Для дальнейшего исследования природы сигналов, ассоциированных с синаптической базальной мембраной, мышцы повреждали, нерв раздавливали, а регенерацию мышечного волокна предотвращали рентгеновским облучением. Регенерирующие аксоны росли к исходным синаптическим зонам, что выявлялось окраской на холинэстеразу, и формировали активные зоны для освобождения медиатора точно напротив участков базальной мембраны, связанных со вторичными синаптическими складками, — и все это происходило в отсутствие клеточных элементов постсинаптической мишени (рис. 24.13D).

В параллельной серии экспериментов МакМахан и его коллеги продемонстрировали, что синаптическая базальная мембрана в регенерирующих мышечных волокнах содержит факторы, запускающие дифференцировку постсинаптической мембраны. Мышцы повреждались, как было описано ранее, а реиннервация предотвращалась удалением большого сегмента нерва. При регенерации новые мышечные волокна образовывали вторичные складки и кластеры АХ рецепторов и ацетилхолинэстеразы точно в зоне контакта с исходной синаптической базальной мембраной (рис. 24.14). Таким образом, сигналы, ассоциированные с синаптической базальной мембраной, при регенерации могут инициировать формирование синаптических специализаций как в мышечных волокнах, так и в нервных окончаниях.

Идентификация агрина

Для идентификации сигнала, связанного с базальной мембраной и инициирующего постсинаптическую дифференцировку, МакМахан и его коллеги использовали морского ската *Torpedo californica*. Из электрических органов этого животного, родственных скелетной мышце, они приготовили экстракты, содержащие базальные мембраны. Добавленные к культуре мышечных волокон, экстракты симулировали эффекты синаптической базальной мембраны на регенерацию мышечных волокон, а именно индуцировали формирование

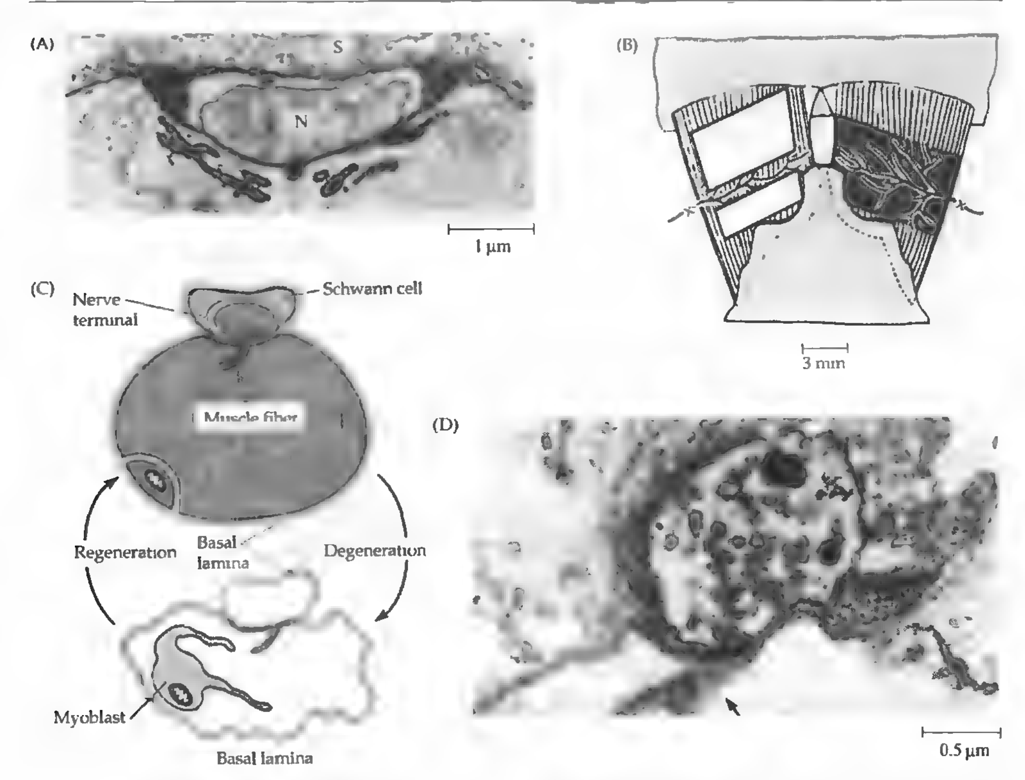


Рис. 24.13. Базальная мембрана и регенерация синапсов. (А) Микрофотография нормального нервно-мышечного синапса лягушки, окрашенного рутением красным, показывающая базальную мембрану, погруженную в постсинаптические складки и окружающую шванновскую клетку (S) и нервное окончание (N). (В) Изображение кожно-грудной мышцы, показывающее замороженный (справа) или перерезанный (слева) участок, с целью вызвать локальное повреждение мышечных волокон. (С) Замораживание приводит к дегенерации и фагоцитозу всех клеточных элементов нервно-мышечного соединения, оставляя целой только базальную мембрану мышечного волокна и шванновской клетки. Новые нервно-мышечные синапсы создаются регенерирующими аксонами и мышечными волокнами. (D) Нерв и мышца были повреждены, регенерация мышечных волокон предупреждена рентгеновским облучением. В отсутствие мышечных волокон аксоны регенерировали, восстанавливали связь с исходными синаптическими зонами и формировали активные зоны.

Fig. 24.13. Basal Lamina and Regeneration of Synapses. (A) Electron micrograph of a normal neuromuscular synapse in the frog, stained with ruthenium red to show the basal lamina that dips into the postsynaptic folds and surrounds the Schwann cell (S) and nerve terminal (N). (B) Diagram of the cutaneous pectoris muscle, showing the region frozen (right) or cut away (left) to damage muscle fibers. (C) Freezing causes all cellular elements of the neuromuscular junction to degenerate and be phagocytized, leaving only the basal lamina sheath of the muscle fiber and Schwann cell intact. New neuromuscular junctions are restored by regenerating axons and muscle fibers. (D) Nerve and muscle were damaged, and regeneration of muscle fibers was prevented by X-irradiation. In the absence of muscle fibers, axons regenerated; contacted original synaptic sites, marked by the tongue of basal lamina that had extended into the junctional fold (arrow); and formed active zones. (After McMahan, Edgington, and Kuffler, 1980; micrographs kindly provided by U. J. McMahan.)

кластеров АХ рецепторов вместе с другими компонентами постсинаптической мембраны (рис. 24.15)[106].

Активный компонент экстрактов, названный **агрином**, был очищен и охарактеризован, а у цыпленка, крысы и ската клонирована соответствующая кДНК[107]. Результаты гибридизации *in situ* и иммуногистохимических исследований продемонстрировали, что агрин синтезируется мотонейронами, транспортируется по аксонам и, освобождаясь, индуцирует дифференцировку постсинаптического аппарата в развивающихся нервно-мышечных синапсах (глава 23)[108]. Затем агрин

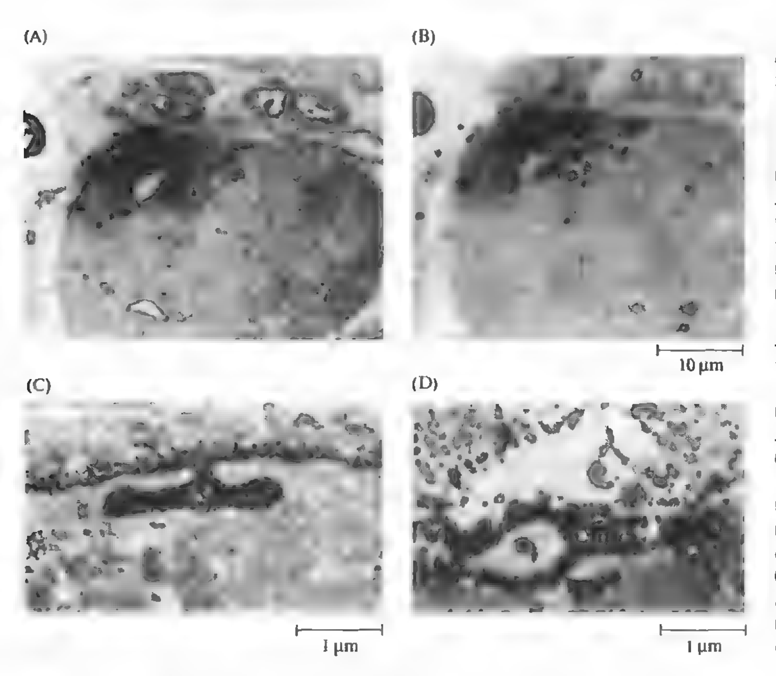


Рис. 24.14. Аккумуляция АХ рецепторов и ацетилхолинэстеразы в исходных синаптических зонах мышечиых волокон, регенерирующих в отсутствие нерва. Мышца была заморожена, как на рис. 24.13B, но регенерация нерва была блокирована. Новые мышечные волокна сформировались в пределах оболочек базальной мембраны. (А и В) Авторадиография регенерированной мышцы с окраской на холинэстеразу, для того чтобы выделить исходную синаптическую зону (в фокусе в части А), и помеченной радиоактивным α-бунгаротоксином, чтобы определить положение АХ рецепторов (серебряные зерна в фокусе в части В). (С) Электронная микрофотография исходной синаптической зоны в регенерированной мышце, отмеченная пероксидазой хрена (HRP), конъюгированной с α-бунгаротоксином. Распределение АХ рецепторов обнаруживается по высокой плотности продукта реакции с HRP, который позволяет различать поверхность мышечного волокна и синаптические складки. (D) Электронная микрофотография исходной синаптической зоны в регенерирующей мышце с окраской на холинэстеразу. Исходная холинэстераза деградировала после заморозки мышцы. Таким образом, выявляемый продукт реакции обусловлен холинэстеразой, синтезированной и аккумулированной в исходной синаптической зоне регенерирующим мышечным волокном.

Fig. 24.14. Accumulation of ACh Receptors and Acetylcholinesterase at Original Synaptic Sites on muscle fibers regenerating in the absence of nerve. The muscle was frozen as in Figure 24.13B, but the nerve was prevented from regenerating. New muscle fibers formed within the basal lamina sheaths. (A and B) Light-microscope autoradiography of a regenerated muscle stained for cholinesterase to maık the original synaptic site (in focus in part A) and incubated with radioactive α-bungarotoxin to label ACh receptors (silver grains in focus in part B). (C) Electron micrograph of the original synaptic site in a regenerated muscle labeled with HRP-α-bungarotoxin. The distribution of ACh receptors is indicated by the dense HRP reaction product, which lines the muscle fiber surface and the junctional folds. (D) Electron micrograph of the original synaptic site in a regenerated muscle stained for cholinesterase. The original cholinesterase was permanently inactivated at the time the muscle was frozen. Thus, the dense reaction product is due to cholinesterase synthesized and accumulated at the original synaptic site by the regenerating muscle fiber. (A and B after McMahan, Edgington, and Kuffler, 1980; C after McMahan and Slater, 1984; D after Anglister and McMahan, 1985; micrographs kindly provided by U. J. McMahan.)

становится частью синаптической базальной мембраны, где участвует в сохранении постсинаптического аппарата и запускает дифференцировку во время регенерации.

Как описано в главе 23, специфичный для мышцы рецептор тирозинкиназы, называемый MuSK, образует часть агринового рецептора. Активация MuSK инициирует внутриклеточное фосфорилирование, что служит пусковым сигналом для агрегации АХ рецепторов.

§ 5. Регенерация в ЦНС млекопитающих

Центральная нервная система взрослого млекопитающего имеет ограниченные возможности для регенерации. Перерезка большинства проводящих путей не сопровождается ростом аксонов и восстановлением функции. Однако, как описано ранее, в некоторых ситуациях после повреждений в центральной нервной системе неповрежденные аксоны могут развет-

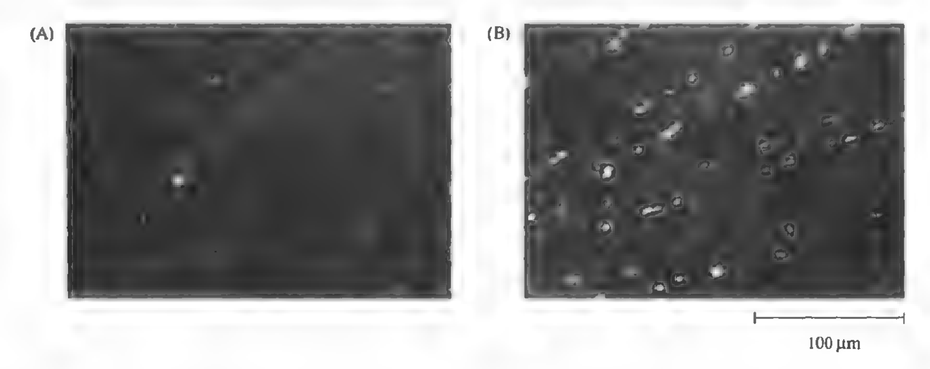


Рис. 24.15. Агрин вызывает агрегацию АХ рецепторов в культуре мышечных трубочек цыпленка. Флуоресцентная микрофотография мышечных трубочек, помеченных родамин-конъюгированным α-бунгаротоксином для выявления АХ рецепторов. (А) Рецепторы с низкой плотностью распределены по поверхности интактных трубочек. (В) Инкубация трубочек с агрином в течение ночи вызывает формирование участков мембраны, в которых происходит аккумуляция АХ рецепторов вместе с другими компонентами постсинаптического аппарата.

Fig. 24.15. Agrin Causes Aggregation of ACh Receptors in chick myotubes in culture. Fluorescence micrographs of myotubes labeled with rhodamine-conjugated α-bungarotoxin to mark ACh receptors. (A) Receptors are distributed over the surface of control myotubes at low density. (B) Overnight incubation with agrin causes the formation of patches at which ACh receptors accumulate, together with other components of the postsynaptic apparatus. (After McMahan and Wallace, 1989.)

вляться и с высокой специфичностью формировать новые синапсы. Более того, при повреждении даже больших участков ЦНС аксоны в благоприятных условиях могут удлиняться на несколько сантиметров и в некоторых случаях формировать синапсы с соответствующими мишенями[109)–111)].

Роль глиальных клеток в регенерации ЦНС

Важнейшую роль в ограничении регенерации в центральной нервной системе играют глиальные клетки (глава 8). Ингибирующая активность глиальных клеток ЦНС была установлена в нескольких типах экспериментов. Во-первых, было показано, что, хотя в ЦНС перерезанные аксоны, как правило, не регенерируют, мотонейроны, локализующиеся в передних рогах спинного мозга, могут восстанавливать поврежденные периферические аксоны (рис. 24.16). Подобным же образом аксоны чувствительных нервов регенерируют к их мишеням на периферии, хотя они и не способны к восстановлению повреждения в пределах ЦНС. Так, после перерезки заднего корешка чувствительные аксоны регенерируют к спинному мозгу, но прекращают свой рост тогда, когда они достигают астроцитов, локализующихся на границе центральной нервной системы. Кроме того, периферические аксоны в зрительной системе не способны проникать в трансплантант зрительного нерва, который имеет в своем составе глиальные клетки[112)]. Эти данные позволяют предположить, что глиальные клетки ЦНС активно ингибируют рост аксонов.

С другой стороны, известно, что, когда нейроны спинальных ганглиев пересаживаются в белое вещество ЦНС с минимальной травматизацией, они способны формировать протяженные аксоны, прорастать в серое вещество и образовывать конечные синаптические разветвления[113)]. Таким образом, при отсутствии травмы, индуцирующей глиальную реакцию, регенерация аксонов не зависит от контакта с глиальными клетками ЦНС.

Если проводящие пути в ЦНС повреждены, астроциты, микроглиальные клетки, менингеальные клетки и предшественники олигодендроцитов аккумулируются в зоне повреждения, формируя глиальный рубец[114)]. Эти клетки продуцируют разнообразные молекулы, включая свободные радикалы, окись азота, производные арахидоновой кислоты и протеогликаны, ингибирующие аксональный рост. Например, Шваб и его коллеги нашли, что олигодендроциты в зрелой ЦНС имеют на своей поверхности белки, обозначаемые N1-35 и N1-250, вызывающие коллапс конуса роста нейронов и ингибирующие рост нервных клеток *in vitro*[111, 115)]. Аппликация моноклональных антител к этим белкам

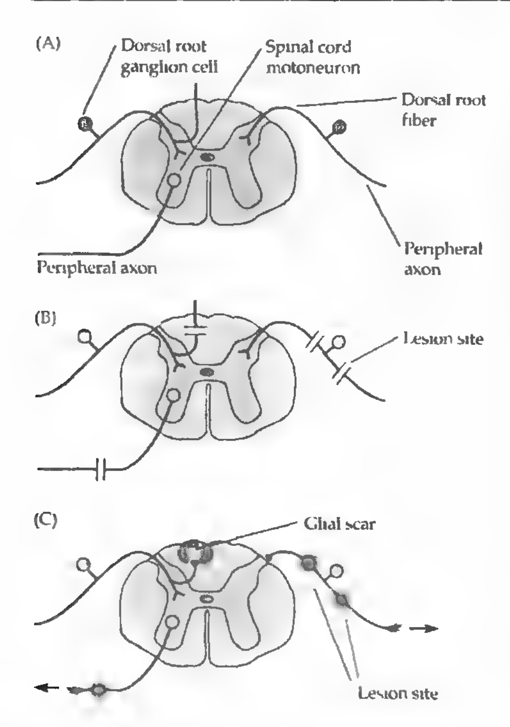


Рис. 24.16. Аксоны чувствительных и двигательных нейронов регенерируют на периферии, но не в ЦНС. (A) Мотонейроны, сенсорные нейроны ганглиев дорзальных корешков (DRG) и их аксональные отростки в нервной системе млекопитающего. (B) Места повреждений аксона. (C) Степень регенерации. Аксоны нейронов DRG и мотонейроны регенерируют через места повреждения в периферических нервах и дорзальных корешках (затемнение на волокнах в местах повреждения). Тем не менее регенерирующие волокна дорзального корешка прекращают рост, достигнув отростков астроцитов, ограничивающих поверхность спинного мозга. Аксоны чувствительных нейронов DRG не регенерируют также через глиальные рубцы (Glial scar), формирующиеся в местах повреждения ЦНС (затемнение с высветленной серединой).

Fig. 24.16. Axons of Sensory and Motor Neurons Regenerate in the Periphery but Not in the CNS. (A) Motoneurons, dorsal root ganglion sensory neurons, and their axonal processes in the mammalian nervous system. (B) Sites of axon lesions. (C) Extent of regeneration. Axons of dorsal root ganglion neurons and motoneurons regenerate through lesion sites in peripheral nerves and dorsal roots. However, regenerating dorsal root fibers stop when they reach the astrocytic processes that delimit the surface of the spinal cord. Axons of dorsal root ganglion sensory neurons also do not regenerate through glial scars that form at lesion sites in the CNS.

нейтрализовала их тормозную активность. Более того, в присутствии антител аксоны могли прорастать через поврежденный участок спинного мозга и частично восстанавливать двигательную функцию, хотя степень регенерации была явно неполной[111, 116, 117]. Аппликация антител способствовала также спраутингу интактных нервных волокон и формированию дополнительных синапсов, что также может играть роль в восстановлении потерянной функции[118]. Механизм действия антител является, по-видимому, достаточно сложным. В качестве дополнительного механизма, участвующего в спраутинге и нейрональном росте, может выступать местное, индуцированное антителами воспаление[119, 120].

Мосты из шванновских клеток и регенерация

шванновские клетки создают благоприятное окружение для роста аксонов нейронов ЦНС. Например, при имплантации сегментов периферических нервов между перерезанными участками спинного мозга мыши или крысы, регенерирующие нервные волокна прорастают в поврежденный участок и заполняют зону повреждения[121]. Имплантант состоит из шванновских клеток и соединительной ткани; периферические аксоны при этом дегенерированы. Подобным же образом способствует росту нейронов культура шванновских клеток, имплантированная в спинной мозг[122]. Этот эффект может быть значительно усилен модификацией шванновских клеток методами генной инженерии, приводящими к продукции повышенного уровня нейротрофических факторов[123]. Введение суспензии инкапсулирующих глиальных клеток в культю перерезанного спинного мозга или в зону электролитического повреждения кортикоспинального тракта также усиливает регенерацию аксонов[124, 125]. Наличие инкапсулирующих глиальных клеток является характерной особенностью обонятельного аппарата, где даже во взрослом организме происходит рождение новых нейронов и прорастание их аксонов в ЦНС.

Поразительный эффект восстановления утерянной функции наблюдается при использовании мостиков (рис. 24.17[126]). Один конец седалищного нерва имплантирован в спинной мозг, а другой — в вышележащий отдел нервной системы (спинной мозг, продолговатый мозг или таламус). Мостики можно даже протягивать от коры больших полушарий головного мозга к другому участку ЦНС

Рис. 24.17. Мостики между продолговатым и спинным мозгом дают возможность нейронам ЦНС прорастать на длинные расстояния. Имплантированный мостик состоит из куска седалищного нерва взрослой крысы с дегенерированными аксонами, с сохранившимися шванновскими клетками. Этот мостик функционирует как канал, по которому могут прорастать центральные аксоны. (A) Место приложения имплантанта. (B) Нейроны метили перерезкой имплантанта и наложением HRP к перерезанным концам. Позиции 1 472 клеточных тел нейронов были помечены ретроградным транспортом HRP у семи крыс с имплантантом. Большинство клеток, посылающих аксоны в имплантант, были расположены вблизи него.

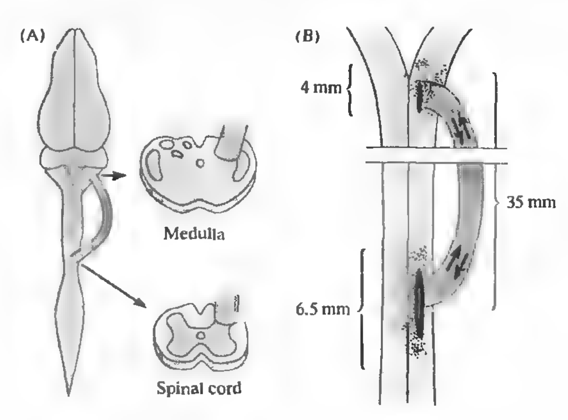


Fig. 24.17. Bridges between Medulla and Spinal Cord enable CNS neurons to grow for prolonged distances. The grafted bridge consists of a segment of adult rat sciatic nerve in which axons have degenerated, leaving Schwann cells. These act as a conduit along which central axons can grow. (A) Sites of insertion of the graft. (B) Neurons are labeled by cutting the graft and applying HRP to the cut ends. Positions of 1472 neuronal cell bodies were labeled by retrograde transport of HRP in seven grafted rats. Most of the cells sending axons into the graft are situated close to its points of insertion. (After David and Aguayo, 1981.)

или к скелетной мышце. После нескольких недель или месяцев имплантант приобретает сходство с нормальным нервным проводником, наполненным миелинизированными или немиелинизированными аксонами. Эти нейроны являются электрически возбудимыми и способными генерировать распространяющиеся нервные импульсы. Более того, они способны ингибироваться стимулами, приложенными выше или ниже зоны имплантации. При перерезке тканей в области мостика и загрузке обрезанных концов пероксидазой хрена (или другими маркерами) можно установить происхождение прорастающих нервных волокон (рис. 24.17B). Такие эксперименты показали, что аксоны, заполнившие мостик, происходят из нейронов, клеточные тела которых лежат внутри центральной нервной системы. Обычно в мостик прорастают только те нейроны, тела которых располагаются на расстоянии не более нескольких миллиметров от мостика. Подобным же образом аксоны, вышедшие из мостика, способны прорастать в центральную нервную систему только на короткую дистанцию.

Не все нейроны ЦНС даже в благоприятном окружении способны удлинять аксоны. Например, при перерезке аксонов клеток Пуркинье мозжечка у взрослых животных выживают все утратившие отростки нейроны, но это не сопровождается регенерацией аксонов, даже если в поврежденный участок имплантируются кусочки эмбрионального мозжечка[127]. Между тем такие имплантанты эффективно стимулируют прорастание аксонов других мозжечковых нейронов. Таким образом, регенерация зависит как от условий, разрешающих или активирующих рост нервных клеток, так и от внутренних характеристик, присущих данному нейрону. Отсутствие способности к регенерации поврежденных отростков у клеток Пуркинье коррелирует с тем, что в их цитоплазме при аксотомии не происходит повышения синтеза белков, обеспечивающих рост аксонов.

Формирование синапсов при регенерации аксонов в ЦНС млекопитающих

Могут ли аксоны, регенерирующие в ЦНС млекопитающих, правильно находить свои мишени и создавать функционирующие синапсы? Эксперименты на регенерирующих аксонах ганглиозных клеток сетчатки дали положительный ответ на этот вопрос[109]. Если после перерезки зрительного нерва в поврежденный участок между глазом и верхним четверохолмием вставляли мостик, состоящий из периферического нерва, аксоны ганглиозных клеток сетчатки прорастали через мост, достигали своей цели, ветвились и образовывали синапсы (рис. 24.18). Под электронным микроскопом регенерированные синапсы, образованные в должных участках клеток-мишеней имели нормальную структуру,

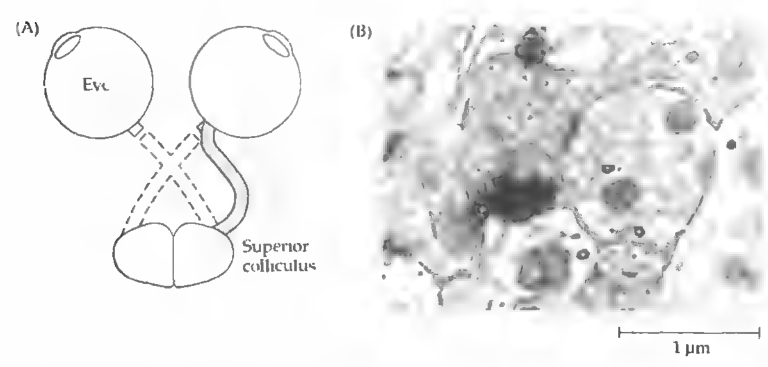


Рис. 24.18. Соединение сетчатки и верхнего бугра с помощью имплантанта периферического нерва у взрослой крысы. (А) Зрительные нервы были пересечены, один из них был замещен отрезком малоберцового нерва длиной 3–4 см (серый цвет). Регенерация тестировалась с помощью меток, антероградно перемещаемых после инъекций в глаз или регистрацией ответов нейронов верхнего бугра на освещение сетчатки. (В) Электронно-микроскопическая ауторадиограмма регенерированной терминали аксона ганглиозной клетки сетчатки в верхнем бугорке. [^{3}H]-меченые аминокислоты были инъецированы в глаз за 2 дня до получения срезов мозга; серебряные зерна, показывающие меченые белки, транспортированные из глаза, служили для распознавания терминалей аксона ганглиозных клеток. Регенерированные терминали были похожи на таковые у контрольных животных; они были заполнены круглыми синаптическими везикулами и формировали асимметричные синапсы.

Fig. 24.18. Reconnection of the Retina and Superior Colliculus through a peripheral nerve graft in an adult rat. (A) The optic nerves were severed, and one was replaced by a 3 to 4 cm segment of the peroneal nerve (grey). Regeneration was tested by injecting anterograde tracers into the eye or recording responses of superior colliculus neurons to light flashed onto the retina. (B) Electron microscope autoradiogram of a regenerated retinal ganglion cell axon terminal in the superior colliculus. [^{3}H]-labeled amino acids were injected into the eye 2 days before the brain was fixed and sectioned; silver grains exposed by radiolabeled proteins transported from the injected eye identify ganglion cell axon terminals. The regenerated terminal resembles those seen in control animals; it is filled with round synaptic vesicles and forms asymmetric synapses. (After Vidal-Sanz, Bray, and Aguayo, 1991; micrograph kindly provided by A. J. Aguayo.)

и являлись функционируюшими, о чем свидетельствовало то, что освещение глаза вызывало генерацию электрических сигналов в постсинаптических клетках.

Регенерация в незрелой ЦНС млекопитающих

По сравнению с нервной системой взрослых, незрелая ЦНС млекопитающих обеспечивает более благоприятные условия для регенерации[110]. Например, если спинной мозг новорожденного опоссума передавлен или перерезан, аксоны прорастают через участок повреждения. Проводимость через поврежденный участок восстанавливается через несколько дней, даже если спинной мозг извлечен и помещен в культуральную среду[128]. Сходные результаты получены на эмбриональном спинном мозге крысы и мыши в условиях культуры. У новорожденного опоссума даже после полного пересечения спинного мозга после заживления наблюдается полная и точная регенерация и отличное восстановление функций. Например, аксоны чувствительных нейронов восстанавливают прямые синаптические связи с двигательными нейронами[129] и животное может координированно ходить, плавать и прыгать[130].

Спинной мозг 9-дневного опоссума регенерирует хорошо, а 12-дневного — уже нет. Поразительным свойством спинного мозга 9-дневного опоссума является отсутствие миелина и малое количество глиальных клеток. Действительно, конец критического периода, в течение которого может осуществляться успешная регенерация, совпадает с появлением олигодендроцитов, миелиновых оболочек и ингибирующих нейрональный рост протеинов N1-35 и N1-250[131]. Сходно с этим, у эмбрионов цыплят нейроны ствола мозга будут успешно регенерировать свои спинальные аксоны, если спинной мозг был рассечен до начала миелинизации[132]. Позже регенерация становится невозможной, за исключением тех случаев, когда миелинизация волокон по какой-то причине запаздывает или если она нарушена. Эти экспериментальные модели дают возможность изучения молекулярных механизмов, облегчающих и ингибирующих регенерацию в центральной нервной системе.

Нейрональные трансплантанты

Наиболее распространенными заболеваниями ЦНС человека являются болезни, обусловленные спонтанной дегенерацией нейронов, такие как болезни Паркинсона, Альцгеймера и Хантингтона. Большинство нервных клеток у взрослых являются постмитотическими; в настоящее время неизвестны физиологические механизмы восстановления утерянных нейронов. Одним из подходов для замещения погибших нервных клеток, предпринятых Бьерклундом и коллегами, являлась трансплантация нервных клеток эмбриона в мозг взрослого организма[133]. В отличие от нейронов взрослого организма, погибающих при трансплантации, нервные клетки эмбрионов или новорожденных животных после перемещения в серое вещество ЦНС взрослого выживали и развивались (рис. 24.19). Имплантированные клетки дифференцировались, проращивали аксоны и освобождали нейротрансмиттеры из нервных терминалей.

Ярким примером такого рода являются эксперименты, в которых после разрушения дофамин-содержащих нейронов черной субстанции эмбриональные нейроны были трансплантированы в базальные ганглии крысы. Гибель нейронов черной субстанции воспроизводит дефицит, напоминающий болезнь Паркинсона у людей[134]. У нормальных животных дофаминергические нейроны черной субстанции, располагающиеся в среднем мозге, иннервируют клетки базальных ганглиев (часть мозга, вовлеченная в программирование движений, главы 14 и 22, аппендикс С). При одностороннем повреждении этого дофаминового тракта результатом было нарушение движения; в ответ на стрессовый сигнал животное поворачивалось в сторону повреждения. Эта асимметрия движений исчезала после трансплантации в базальные ганглии на стороне повреждения дофаминсодержащих эмбриональных нейронов черной субстанции[135]. Ультраструктурные исследования показали, что трансплантированные нейроны удлиняют аксоны, проникая в окружающие участки мозга и формируя синапсы с нейронами реципиента.

Степень функциональной компенсации в результате операции трансплантации нейронов зависит от успешности восстановления синаптических контактов. Удивительно, что полноценная интеграция нейронов в сложную нейрональную сеть мозга происходит нормально у взрослого[136]. Так же хорошо у взрослых происходит восстановление после имплантации эмбриональной ткани в поврежденную кору, гиппокамп и полосатое тело[133]. Трансплантированная в мозг новорожденной крысы эмбриональная сетчатка способна к формированию специфических функциональных синапсов, восстанавливая таким образом соответствующие зрительные рефлексы[137]. Трансплантация эмбриональной энторинальной коры взрослым крысам с повреждениями энторинальной коры головного мозга может реиннервировать деафферентированные зоны гиппокампа, формировать синаптические контакты и частично восстанавливать дефицит пространственной памяти[138, 139].

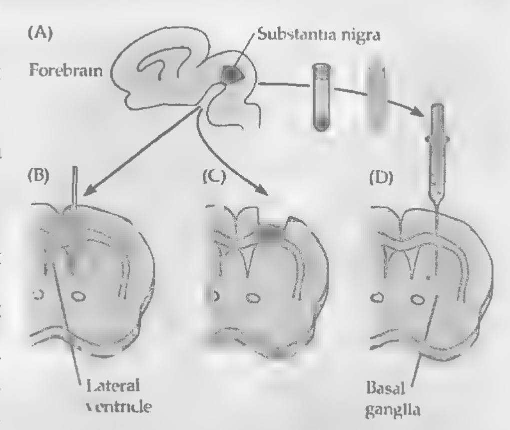


Рис. 24.19. Процедура трансплантации ткани эмбриона в мозг взрослой крысы. Ткань, богатая клетками, содержащими дофамин, бралась из черной субстанции (А) и инъецировалась в боковой желудочек (В) или имплантировалась в пространство коры, покрывающей базальные ганглии (С). Как альтернативный подход, суспензия диссоциированных клеток черной субстанции могла быть инъецирована непосредственно в базальные ганглии (D). Эти эмбриональные клетки выживали, росли и секретировали трансмиттер.

Fig. 24.19. Procedures for Transplanting Embryonic Tissue into adult rat brain. Tissue rich in cells containing dopamine is dissected from the substantia nigra (A) and is injected into the lateral ventricle (B) or grafted into a cavity in the cortex overlying the basal ganglia (C). Alternatively, a suspension of dissociated substantia nigra cells can be injected directly into the basal ganglia (D). Such embryonic cells survive, sprout, and secrete transmitter. (After Dunnett, Björklund, and Stenevi, 1983.)

Ярким примером регенерации нервной системы является анатомическая и функциональная интеграция трансплантированных эмбриональных клеток Пуркинье мозжечка у взрослой мутантной мыши с дегенерацией

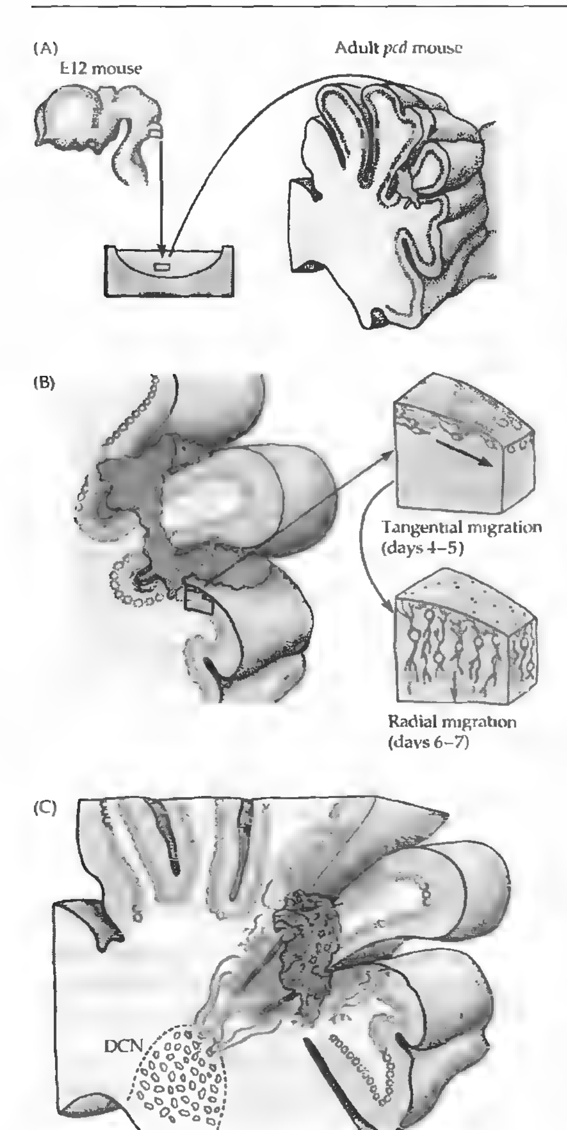


Рис. 24.20. Реконструкция нейрональной сети мозжечка трансплантацией мозговой ткани эмбриона во взрослую мутантную мышь (*pcd*), у которой клетки Пуркинье дегенерируют вскоре после рождения. (А) Цельные участки мозжечковой ткани от 12-дневного эмбриона (Е12) были инъецированы в мозжечок 2–4-месячных pcd мышей. (В) К 4–5 дню после трансплантации клетки Пуркинье мигрировали от трансплантанта по линии, касательной к мозговой поверхности. Через 6–7 дней после трансплантации клетки Пуркинье начинали мигрировать в радиальном направлении внутрь ткани мозжечка по глиальным клеткам Бергмана, пронизывая молекулярный слой. (С) Донорские клетки Пуркинье, находящиеся на расстоянии не более 600 мкм от глубинных ядер мозжечка (ГЯМ) реципиента, тянут аксоны к ГЯМ и формируют синаптический контакт на специфических мишенях. Те же донорские клетки Пуркинье, которые располагаются на большем расстоянии, контактируют преимущественно с донорскими же клетками ГЯМ, попавшими сюда вместе с трансплантантом.

Fig. 24.20. Reconstruction of Cerebellar Circuits by transplantation of embryonic cerebellar tissue into an adult *pcd* mouse, a mutant in which Purkinje cells degenerate shortly after birth. (A) Solid pieces of cerebellar primordium from a 12-day embryo (E12) were injected into the cerebellum of a 2- to 4-month-old pcd mouse. (B) By four to five days after transplantation, Purkinje cells have migrated out of the graft tangentially along the cerebellar surface. During days six and seven after transplantation, Purkinje cells migrate radially inward along Bergmann glial cells, penetrating the host molecular layer. (C) Donor Purkinje cells that lie within 600 μm of the host deep cerebellar nuclei (DCN) extend axons into the DCN and make synaptic contacts on their specific targets. Donor Purkinje cells farther from the host DCN make contact with donor DCN cells in the graft remnant. (After Sotelo and Alvarado-Mallart, 1991.)

собственных клеток Пуркинье (рис. 24.20)[140]. Сотело и его коллеги трансплантировали диссоциированные клетки Пуркинье либо целые кусочки эмбриональной ткани в мозжечок взрослой мутантной мыши. Донорские клетки Пуркинье мигрировали из трансплантанта в зоны, где исходно располагались дегенерировавшие впоследствии клетки Пуркинье. Они продвигались вдоль глиальных клеток Бергмана, в которых была индуцирована экспрессия белков, управляющих движением донорских клеток Пуркинье[141]. Через 2 недели многие трансплантированные клетки формировали дендритные деревья, похожие на разветвления обычных клеток Пуркинье, лиановидные волокна образовывали синапсы сначала на клеточном теле, затем на проксимальных дендритах, а параллельные волокна иннервировали дистальные дендриты. Характерные синаптические потенциалы были зарегистрированы после стимуляции входов лиановидных и мшистых волокон. Тем не менее имплантированные клетки редко устанавливали синаптические связи с их обычны-

ми мишенями в глубоких ядрах мозжечка. Вместо этого они стремились установить связи с донорскими нейронами, перенесенными и выжившими в составе трансплантанта. Несмотря на это, проведенные эксперименты демонстрируют, что трансплантированные нервные клетки могут в значительной мере интегрироваться в нейрональную сеть взрослого организма.

Ясно, что многие нейроны ЦНС млекопитающих сохраняют даже во взрослом состоянии удивительную способность к регенерации аксонов и дендритов и восстановлению соответствующих синаптических связей. Главной причиной несостоятельности регенерации после большинства повреждений ЦНС является ингибирование врожденных регенеративных возможностей факторами, производимыми глиальными клетками и трофическими молекулами, влияющими на рост нейронов. Идентификация механизмов подавления эндогенных тормозных факторов является областью активных научных исследований, так же как и изучение нейрональных стволовых клеток, представляющих собой потенциальный источник новых глиальных клеток и нейронов, чьи свойства могут быть адаптированы методами генной инженерии (глава 23)[142]. Успехи в этой области в сочетании с развитием трансплантационной техники дают надежду на восстановление функционального дефицита, возникающего в результате повреждений и нейродегенеративных заболеваний ЦНС.

Выводы

- Прн перерезке аксона в нервной системе позвоночных происходит дегенерация дистального отдела нерва. Аксотомированная клетка либо подвергается хроматолизу, либо погибает.
- Многие пресинаптические терминали, иннервирующие аксотомированные нейроны, подвергаются ретракции; оставшиеся окончания освобождают сниженное количество квантов нейротрансмиттера.
- В денервированных скелетных мышечных волокнах в экстрасинаптических участках происходит синтез и экспрессия новых АХ рецепторов, что делает мышцу гиперчувствительной к АХ. Денервированные нейроны также становятся гиперчувствительными к трансмиттерам, освобождающимся из поврежденных синаптических аксонов.
- Мышечная активность является важным фактором, определяющим количество АХ рецепторов и их распределение. Мышечная активность влияет также на скорость деградации и восстановления АХ рецепторов.
- У взрослых млекопитающих или лягушки иннервированная мышца не принимает иннервации дополнительным нервом. В отличие от этого, нервные волокна способны формировать новые синапсы на денервированных или поврежденных мышечных волокнах.
- Частично денервированные мышцы и нейроны способны вызвать рост новых разветвлений у неповрежденных близлежащих нервов и формирование новых синапсов.
- Шванновские клетки периферической нервной системы обеспечивают особое окружение нейронов, стимулирующее рост аксонов.
- Синаптический участок базальной мембраны, окружающий мышечные волокна, ассоциирован с таким фактором, как агрин, который индуцирует синаптические специализации в регенерирующих окончаниях аксонов и мышечных волокнах. Агрин является протеогликаном, синтезирующимся двигательными нейронами и освобождающимся из окончаний их аксонов. После выделения он становится ассоциированным с синаптической базальной мембраной и индуцирует формирование пре- и постсинаптических специализаций.
- Центральная нервная система взрослых млекопитающих обладает ограниченными возможностями для регенерации.
- Шванновские клетки в форме периферического нервного трансплантанта или инъецированные как клеточная суспензия в зону повреждения создают благоприятное окружение для роста аксонов нейронов ЦНС млекопитающих.
- В ЦНС эмбрионов и новорожденных млекопитающих способна происходить эффективная регенерация после повреждения.

- Нейроны эмбрионов или новорожденных животных, так же как и нейроны и глиальные клетки, происходящие от нейрональных стволовых клеток, выживают и растут при трансплантации в ЦНС взрослого млекопитающего. Трансплантированные клетки могут быть интегрированы в существующие нейрональные сети и частично восстанавливать утерянную функцию.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Björklund, A. 1991. Neural transplantation—An experimental tool with clinical possibilities. *Trends Neurosci.* 14: 319–322.
- Fitch, M.T., and Silver, J. 1999. Beyond the glial scar: Cellular and molecular mechanisms by which glial cells contribute to CNS regenerative failure. In M. H. Tuszynski and J. H. Kordower (eds.), *CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances.* Academic Press, San Diego, CA, pp. 55–88.
- Martinez-Serrano, A., and Björklund, A. 1997. Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci.* 20: 530–538.
- Muller, H.W., and Stoll, G. 1998. Nerve injury and regeneration: Basic insights and therapeutic interventions. *Curr. Opin. Neurol.* 11: 557–562.
- Nicholls, J., and Saunders, N. 1996. Regeneration of immature mammalian spinal cord after injury. *Trends Neurosci.* 19: 229–234.
- Sanes, J. R., and Lichtman, J.W. 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 389–442.
- Schwab, M. E., and Bartholdi, D. 1996. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.* 76: 319–370.
- von Bernhardi, R., and Muller, K.J. 1995. Repair of the central nervous system: Lessons from lesions in leeches. *J. Neurobiol.* 27: 353–366.

Статьи

- Björklund, A., Dunnett, S. B., Stenevi, U., Lewis, N. E., and Iversen, S. D. 1980. Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: Functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.* 199: 307–333.
- Blackshaw, S. E., Nicholls, J. G., and Parnas, I. 1982. Expanded receptive fields of cutaneous mechanoreceptor cells after single neurone deletion in leech central nervous system. *J. Physiol.* 326: 261–268.
- Brown, M. C., and Ironton, R. 1977. Motor neurone sprouting induced by prolonged tetrodotoxin block of nerve action potentials. *Nature* 265: 459–461.
- Burden, S. J., Sargent, P. B., and McMahan, U. J. 1979. Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. *J. Cell Biol.* 82: 412–425.
- David, S., and Aguayo, A. J. 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214: 931–933.
- Davies, S. J. A., Fitch, M. T., Memberg, S. P., Hall, A. K., Raisman, G., and Silver, J. 1997. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390: 680–683.
- Lømo, T., and Rosenthal, J. 1972. Control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. *J. Physiol.* 221: 493–513.
- Miledi, R. 1960. The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibers after complete or partial denervation. *J. Physiol.* 151: 1–23.
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., and Sakmann, B. 1986. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321: 406–411.
- Sanes, J. R., Marshall, L. M., and McMahan, U. J. 1978. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. *J. Cell Biol.* 78: 176–198.
- Saunders, N. R., Kitchener, P., Knott, G. W., Nicholls, J. G., Potter, A. and Smith, T. J. 1998. Development of walking, swimming and neuronal connections after complete spinal cord transection in the neonatal opossum, Monodelphis domestica. *J. Neurosci.* 18: 339–355.
- Schwab, M. E., and Caroni, P. 1988. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J. Neurosci.* 8: 2381–2393.
- Son, Y-J., and Thompson, W. J. 1995. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14: 133–141.
- Wilson Horch, H. L., and Sargent, P. B. 1996. Effects of denervation on acetylcholine receptor clusters on frog cardiac ganglion neurons as revealed by quantitative laser scanning confocal microscopy. *J. Neurosci.* 16: 1720–1729.

Цитированная литература

1. Matthey, R. 1925. *C. R. Soc. Biol.* 93: 904–906.
2. Purves, D., and Lichtman, J. W. 1985. *Principles of Neural Development.* Sinauer, Sunderland, MA.
3. von Bernhardi, R., and Muller, K. J. 1995. *J. Neurobiol.* 27: 353–366.
4. Grafstein, B. 1983. In *Nerve, Organ, and Tissue Regeneration: Research Perspectives.* Academic Press, New York, pp. 37–50.
5. Lieberman, A. R. 1971. *Int. Rev. Neurobiol.* 14: 49–124.
6. Muller, H. W., and Stoll, G. 1998. *Curr. Opin. Neurol.* 11: 557–562.
7. Purves, D. 1975. *J. Physiol.* 252: 429–463.
8. Brenner, H. R., and Johnson, E. W. 1976. *J. Physiol.* 260: 143–158.
9. Brenner, H. R., and Martin, A. R. 1976. *J. Physiol.* 260: 159–175.
10. Matthews, M. R., and Nelson, V. H. 1975. *J. Physiol.* 245: 91–135.
11. Rotshenker, S. 1988. *Trends Neurosci.* 11: 363–366.
12. Lindsay, R. M. 1996. *Ciba Found. Symp.* 196: 39–48.
13. Nja, A., and Purves, D. 1978. *Physiol.* 277: 55–75.
14. Cannon, W. B., and Rosenbluth, A. 1949. *The Supersensitivity of Denervated Structures: Law of Denervation.* Macmillan, New York.
15. Purves, D., and Sakmann, B. 1974. *J. Physiol.* 239: 125–153.
16. Belmar, J., and Eyzaguirre, C. 1966. *J. Neurophysiol.* 29: 425–441.
17. Brown, G. L. 1937. *J. Physiol.* 89: 438–461.
18. Kallen, R. G., et al. 1990. *Neuron* 4: 233–242.
19. Guth, L. 1968. *Physiol. Rev.* 48: 645–687.
20. Spector, S. A. 1985. *J. Neurosci.* 5: 2189–2196.
21. Attaix, D., et al. 1994. *Reprod. Nutr. Dev.* 34: 583–597.
22. Axelsson, J., and Thesleff, S. 1959. *J. Physiol L* 147: 178–193.
23. Miledi, R. 1960. *J. Physiol.* 151: 1–23.
24. Katz, B., and Miledi, R. 1964. *J. Physiol.* 170: 389–396.
25. Fambrough, D. M. 1979. *Physiol. Rev.* 59: 165–227.
26. Salpeter, M. M., and Loring, R. H. 1985. *Prog. Neurobiol.* 25: 297–325.
27. Scheutze, S. M., and Role, L. M. 1987 *Annu. Rev. Neurosci.* 10: 403–457.
28. Merlie, J. P., and Sanes, J. R. 1985. *Nature* 317: 66–68.
29. Bursztajn, S., Berman, S. A., and Gilbert, W. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2928–2932.
30. Fontaine, B., and Changeux,).-P. 1989. *J. Cell Biol.* 108: 1025–1037.
31. Salpeter, M. M., and Marchaterre, M. 1992. *J. Neurosci.* 12: 35–38.
32. Sala, C., et al. 1997. *J. Neurosci.* 17: 8937–8944.
33. Xu, R., and Salpeter, M. M. 1995. *J. Cell. Physiol.* 165: 30–39.
34. Mishina, M., et al. 1986. *Nature* 321: 406–411.
35. Shyng, S.-L, and Salpeter, M. M. 1990. *J. Neurosci.* 10: 3905–3915.
36. O'Malley, J., Moore, C. T., and Salpeter, M. M. 1997. *J. Ceil Biol.* 138: 159–165.
37. Lømo, T., and Rosenthal, J. 1972. *J. Physiol.* 221: 493–513.
38. Berg, D. K., and Hall, Z. W. 1975. *J. Physiol.* 244: 659–676.
39. Witzemann, V., Brenner, H-R., and Sakmann, B. 1991. *J. Cell Biol.* 114: 125–141.
40. Purves, D., and Sakmann, B. 1974. *J. Physiol.* 237: 157–182.
41. Duclert, A., and Changeux, J. P. 1995. *Physioi Rev.* 75: 339–368.
42. Fumagalli, G., et al. 1990. *Neuron* 4: 563–569.
43. Rotzler, S., Schramek, H., and Brenner, H. R. 1991. *Nature* 349: 337–339.
44. Shyng, S.-L, Xu, R., and Salpeter, M. M. 1991. *Neuron* 6: 469–475.
45. Caroni, P., et al. 1993. *J. Neurosci.* 13: 1315–1325.
46. Lemke, G. 1996. *MoL Celt. Neurosci.* 7: 247–262.
47. Si, J., and Mei, L 1999. *Brain Res. MoL. Brain Res.* 67: 18–27.
48. Tansey, M. G., Chu, G. C., and Merlie, J. P. 1996. *J. Cell Biol.* 134: 465–476.
49. Si, J., Luo, Z., and Mei, L 1996. *Biol. Chem.* 271: 19752–19759.
50. Altiok, N., Altiok, S., and Changeux, J. P. 1997. *EMBOJ.* 16: 717–725.
51. Harris, A. J., Kuffler, S. W., and Dennis, M. L. 1971. *Proc. R. Soc. Lond. B* 177: 541–553.
52. Wilson Horch, H. L., and Sargent, P. B. 1996. *J. Neurosci.* 16: 1720–1729.
53. Sargent, P. B., and Pang, D. Z. 1989. *J. Neurosci.* 9: 1062–1072.
54. Kuffler, S. W., Dennis, M. J., and Har-ris, A. J. 1971. *Proc. R. Soc. Lond. B* 177: 555–563.
55. Dennis, M. J., and Sargent, P. B. 1979. *J. Physiol* 289: 263–275.
56. Sargent, P. B., et al. 1991. *J. Neuroscl.* 11: 3610–3623.
57. Streichert, L. C., and Sargent, P. B. 1992. *J. Physioi.* 445: 249–260.
58. McEachern, A. E., Jacob, M. H., and Berg, D. K. 1989. *J. Neurosci.* 9: 3899–3907.
59. Loring, R. H., and Zigmond, R. E. 1987. *J. Neurosci.* 7: 2153–2162.
60. Dunn, P. M., and Marshall, L. M. 1985. *J. Physioi* 363: 211–225.

61. Wilson Horch, H. L., and Sargent, P. B. 1995. *J. Neurosci.* 15: 7778–7795
62. Jansen, J. K. S., et al. 1973. *Science* 181: 559–561.
63. Son, Y. J., and Thompson, W. J. 1995. *Neuron* 14: 125–132.
64. Thesleff, S. 1960. *J. Physiol.* 151: 598–607.
65. Fex, S., et al. 1966. *J. Physiol.* 184: 872–882.
66. Diamond, J., and Miledi, R. 1962. *J. Physiol.* 162: 393–408.
67. Frank, E., and Fischbach, G. D. 1979. *J. CellBiol.* 83: 143–158.
68. Van Essen, D., and Jansen, J. K. 1974. *Acta Physiol. Scand.* 91: 571–573.
69. Cohen, M. W. 1972. *Brain Res.* 41: 457–463.
70. Meier, T., and Wallace, B. G. 1998. *BioEssays* 20: 819–829.
71. Brown, M. C., Holland, R. L., and Hop-kins, W. G. 1981. *Anna. Rev Neurosci.* 4: 17–42.
72. Brown, M. C., and Ironton, R. 1977. *Nature* 265: 459–461.
73. Duchen, L. W., and Strich, S. J. 1968. *Q. J. Exp. Physiol.* 53: 84–89.
74. Holland, R. L. and Brown, M. C. 1980. *Science* 207: 649–651.
75. Son, Y-J., and Thompson, W. J. 1995. *Neuron* 14: 133–141.
76. Bowling, D., Nicholls, J. G., and Parnas, I. 1978. *J. Physiol.* 282: 169–180.
77. Blackshaw, S. E., Nicholls, J. G., and Parnas, I. 1982. *J. Physiol.* 326: 261–268.
78. Parnas, I. 1987. *J. Exp. Biol.* 132: 231–247.
79. Korneev, S., et al. 1997. *Inv. Neurosci.* 3: 185–192.
80. Deller, T., and Frotscher, M. 1997. *Prog. Neurobiol.* 53: 687–727.
81. Guenard, V., Xu, X. M., and Bunge, M. B. 1993. *Sem. Neurosci.* 5: 401–411.
82. Heumann, R., et al. 1987. *J. Cell BioL* 104: 1623–1631.
83. Meyer, M., et al. 1992. *J. Cell BioL* 119: 45–54.
84. Johnson, E. M., jr., Taniuchi, M., and DiStefano, P. S. 1988. *Trends Neurosci.* 11: 299–304.
85. Skene, J. H. P., and Shooter, E. M. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA So*: 4169–4173.
86. Fullerton, S. M., Strittmatter, W. J., and Matthew, W. D. 1998. *Exp. Neurol.* 153: 156–163.
87. Goodrum, J. F., et al. 1995. *J. Neurochem.* 64: 408–416.
88. Banner, L R., and Patterson, P. H. 1994. *Proc. NatlAcad. Sd. USA* 91: 7109–7113.
89. Livesey, F. J., et al. 1997. *Nature* 390: 614–618.
90. Wigston, D. J., and Sanes, J. R. 1985. *J. Neurosci.* 5: 1208–1221.
91. Purves, D., Thompson, W., and Yip, J. W. 1981. *J. Physiol* 313: 49–63.
92. Laskowski, M. B., and Sanes, J. R. 1988. *J. Neurosci.* 8: 3094–3099.
93. Fawcett, J. W., and Keynes, R. J. 1990. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 43–60.
94. Dennis, M. J., and Yip, J. W. 1978. *J. Physiol* 274: 299–310.
95. Bixby, J. L. and Van Essen, D. C. 1979. *Nature* 282: 726–728.
96. Langley, J. N., and Anderson, H. K. 1904. *J. Physiol.* 31: 365–391.
97. Grinnell, A. D., and Rheuben, M. B. 1979. *J. Physiol.* 289: 219–240.
98. Kuffler, S. W., and Vaughan Williams, E. M. 1953. *J. Physiol.* 121: 289–317.
99. Miledi, R., Stefani, E., and Steinbach, A. B. 1971. *J. Physiol.* 217: 737–754.
100. Close, R. I.1972. *Physiol. Rev.* 52: 129–197.
101. Salmons, S., and Sreter, F. A. 1975. *J. Anat.* 120: 412–415.
102. Sanes, J. R., Marshall, L M., and McMahan, U. J. 1978. *J. Cell Biol.* 78: 176–198.
103. Burden, S. J., Sargent, P. B., and McMahan, U. J. 1979. *J. Cell Biol.* 82: 412–425.
104. McMahan, U. J., and Slater, C. R. 1984. *J. Cell Biol.* 98: 1453–1473.
105. Anglister, L, and McMahan, U. J. 1985. *J. Cell Biol.* 101: 735–743.
106. McMahan, U. J., and Wallace, B. G. 1989. *Dev. Neurosci.* 11: 227–247.
107. Bowe, M. A., and Fallen, J. R. 1995. *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 443–462.
108. McMahan, U. J. 1990. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50: 407–418.
109. Bray, G. M., et al. 1991. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633: 214–228.
110. Nicholls, J., and Saunders, N. 1996. *Trends Neurosci.* 19: 229–234.
111. Schwab, M. E., and Bartholdi, D. 1996. *Physiol. Rev.* 76: 319–370.
112. Aguayo, A. J., et al. 1978. *Neurosci. Lett.* 9: 97–104.
113. Davies, S. J. A., et al. 1997. *Nature* 390: 680–683.
114. Fawcett, J. W., and Asher, P. A. 1999. *Brain Res. Bull.* 49: 377–391.
115. Schwab, M. E., and Caroni, P. 1988. *J. Neurosci.* 8: 2381–2393.
116. Schnell, L, and Schwab, M. E. 1990. *Nature* 343: 269–272.
117. Bregman, B. S., et al. 1995. *Nature* 378: 498–501.
118. Z'Graggen, W. J., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 4744–4757.
119. Rabchevsky, A. G., and Streit, W. J. 1997. *J. Neurosci. Res.* 47: 34–48.
120. Fitch, M. T., and Silver, J. 1999. In *CNS Regenerotion: Basic Sdence and Clinical Advances.* Academic Press, San Diego, pp. 55–88.
121. Richardson, P. M., McGuinness, U. M., and Aguayo, A. J. 1980. *Nature* 284: 264–265.
122. Xu, X. M., et al. 1997. *J. Neurocytol.* 26: 1–16.

123. Menei, P., et al. 1998. *Eur. J. Neurosci.* 10: 607–621.
124. Ramon-Cueto, A., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 3803–3815.
125. Li, Y., Field, P. M., and Raisman, G. 1998. *J. Neurosci.* 18: 10514–10524.
126. David, S., and Aguayo, A. J. 1981. *Science* 214: 931–933.
127. Zagrebelsky, M., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 7912–7929.
128. Treherne, J. M., et al. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 431–434.
129. Lepre, M., Fernandez, J., and Nicholls, J. G. 1998. *Eur. J. Neurosci.* 10: 2500–2510.
130. Saunders, N. R., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 339–355-
131. Varga, Z. M., et al. 1995. *Eur. J. Neurosci.* 7: 2119–2129.
132. Keirstead, H. S., et al. 1995. *J. Neurosci.* 15: 6963–6974.
133. Bjorklund, A. 1991. *Trends Neurosci.* 14: 319–322.
134. Ridley, R. M., and Baker, H. F. 1991. *Trends Neurosci.* 14: 366–370.
135. Bjorklund, A., et al. 1980. *Broin Res.* 199: 307–333.
136. Luskin, M. 1993. *Neuron* 11: 173–189.
137. Radel, J. D., Kustra, D. J., and Lund, R. D. 1995. *Neuroscience* 68: 893–907.
138. Zhou, W., Raisman, G., and Zhou, C. 1998. *Brain Res.* 788: 202–206.
139. Zhou, W., et al. 1998. *Brain Res.* 792: 97–104.
140. Sotelo, C., and Alvarado—Mallart, R. M. 1991. *Trends Neurosci.* 14: 350–355.
141. Sotelo, C., et al. 1994. *J. Neurosci.* 14: 124–133.
142. Martinez—Serrano, A., and Bjorklund, A. 1997. *Trends Neurosci.* 20: 530–538.

Глава 25

Критические периоды развития зрительной и слуховой систем

Последствия правильного и неправильного установления связей изучались в зрительной системе новорожденных котят и обезьян. Рецептивные поля нейронов сетчатки, латерального коленчатого тела и зрительной коры уже к рождению имели строение, аналогичное взрослым животным, кроме слоя 4 зрительной коры. К моменту рождения кортикальные клетки в слое 4 управляются обоими глазами, и в течение первых 6 недель жизни они формируют связи подобные таковым у взрослых, когда каждая клетка слоя 4 отвечает только на сигналы от одного глаза, в то время как клетки, локализующиеся в других слоях, продолжают получать бинокулярную информацию. Если в течение первых трех месяцев жизни один из глаз остается закрытым, это приводит к слепоте на этот глаз и потере его способности управлять кортикальными клетками. Кортикальные колонки, получающие сигналы от депривированного глаза, уменьшаются в размерах, в то время как колонки, получающие сигналы от противоположного, недепривированного, — увеличиваются.

Закрытие глаза у взрослого животного не влияет на колоночную архитектуру зрительной коры или на ответы корковых клеток. Во время критических периодов можно добиться обратного развития изменений, вызванных сенсорной депривацией, если открыть ранее закрытый глаз и закрыть недепривированный. Дополнительным доказательством наличия конкуренции между двумя глазами служит эксперимент, в котором оба глаза остаются закрытыми в раннем возрасте. Когда ни один из глаз не имеет преимуществ, продолжает развиваться нормальная колоночная архитектура, однако каждая клетка в коре при этом управляется только одним глазом. Подобным же образом при подрезании мышц глазного яблока у детенышей обезьян (что приводило к косоглазию (страбизму)), только небольшое количество нейронов получало сигналы от обоих глаз, хотя каждый глаз получал нормальное количество света. Роль функциональной активности в доминировании того или иного глаза также может быть показана в экспериментах, в которых блокада импульсов в обоих зрительных нервах при помощи тетродотоксина предотвращала разделение коры на колонки глазного доминирования. Спонтанная импульсная активность и нейротрофины (neurotrophins) могут также влиять на правильное формирование связей коры.

У незрелых совят развитие слуховой системы также значительно выражено в критические периоды. Призмы, помещенные перед глазами, приводят к смещенному расположению рецептивных полей. Таким образом возникает диспропорция между картами окружающего пространства в четверохолмии (tectum), соответствующими зрительным (верхние холмики) и слуховым (нижние холмики) ощущениям. В течение первых месяцев жизни это несоответствие корректируется в результате изменения карты окружающего пространства в слуховой коре. По прошествии критического периода подобного рода сдвиги становятся уже невозможны. У сов, выращиваемых в специальных условиях, когда они получают большое количество сенсорного опыта, критический период, в течение которого возможны изменения в связях коры, удлиняется. Эксперименты с сенсорной депривацией являются важными для понимания развития высших функций мозга.

Мы несколько раз подчеркивали, что для правильной работы нервной системы требуется высокая специфичность ее связей. Также понятно, что развитие связей между нейронами продолжается и после рождении на протяжении различного периода времени у разных животных. Например, котята рождаются слепыми на оба глаза. Если мы поднимем веко,

чтобы свет попал в глаз, это приведет к сужению зрачка, хотя раньше этот котенок никогда не видел света и является полностью слепым[1]. К 10-му дню жизни котенка появляются первые признаки зрения, и, таким образом, он начинает распознавать объекты и паттерны. Когда котята вместо нормальных условий выращиваются в темноте, у них сохраняется зрачковый рефлекс, однако они остаются слепыми. Как полагают, имеется иерархия уровней восприятия, с «постоянными» и «переменными» связями, образующимися в разных частях мозга.

Изменения в функционировании зрительной системы во время развития порождают ряд вопросов. Каковы удельные доли генетических факторов и приобретаемого опыта в данном процессе? До какой степени те нейронные сети, которые необходимы для зрения, уже сформировались и готовы к работе к моменту рождения? Какое значение в их развитии имеет свет, падающий на сетчатку? В чем причина того, что котенок, выращенный в темноте, слепой: связано ли это с тем, что не сформировались какие-то связи в коре, или произошло разрушение каких-то ранее сформированных связей? Все эти концепции можно охарактеризовать одной фразой: «природа и воспитание»[*]. С накоплением знаний это выражение трансформировалось в «природа или воспитание» или даже более строго: «природа против воспитания». В этой главе будет показано, что оба эти фактора (как и следовало ожидать) являются необходимыми.

Зрительная система является удобным объектом для прямого изучения вопросов, связанных с развитием, потому что пункты переключения сигнала в коре (relay stations) легко достижимы и количество света, а также естественные стимулы можно легко варьировать. В пределах зрительной системы мы опять отдельно выделяем эксперименты, выполненные на обезьянах и кошках. Для достижения цели более удобно начать эту главу с подробного рассмотрения работ, результаты которых логически следуют из материалов, представленных в главах 20 и 21. Работы, выполненные на незрелой зрительной системе, дают основу для анализа других сенсорных систем, в частности слуховой системы амбарной совы (*barn owl*). Они также дают возможность предполагать, какие механизмы играют роль в модификации корковых связей в начальный период жизни.

§ 1. Зрительная система у новорожденных обезьян и котят

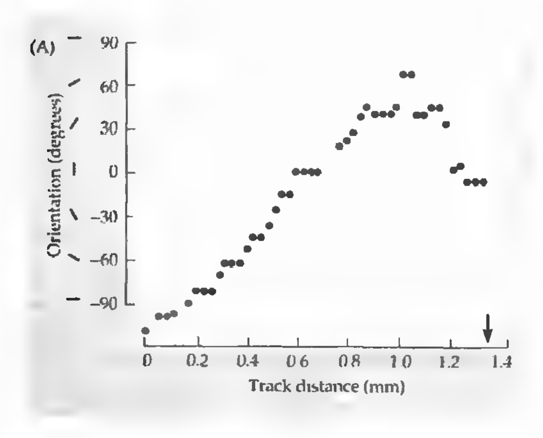
Имеется много данных об организации корковых связей, которые лежат в основе восприятия зрительной информации у взрослых кошек и обезьян. Простая клетка в коре избирательно «узнает» один строго определенный тип зрительных стимулов, такой как движение узкой вертикально ориентированной полоски света, расположенной в определенном месте зрительного поля обоих глаз. Подобного рода ответы возможны благодаря точным и определенным образом организованным связям между клетками коры, сетчатки и латерального коленчатого тела (главы 20 и 21). Естественным является любопытство: присутствуют ли эти клетки и связи уже в мозгу новорожденного животного, или они развиваются как результат приобретенного зрительного опыта, когда зрительные образы в раннем периоде жизни каким-то образом переориентируют случайный набор существующих связей, модифицируя его под определенную задачу.

Для изучения обезьян, не имеющих зрительного опыта, новорожденных обезьян отбирали сразу после рождения (или кесарева сечения), после чего за ними ухаживали таким образом, чтобы исключить зрительные стимулы. Для предотвращения формирования зрения до того периода, когда обезьяны станут достаточно взрослыми для изучения, проводили сшивание век или на роговицу накладывали полупрозрачный материал, который пропускал свет, однако изображение воспринималось очень размыто. Подобным же образом в течение первых недель жизни исследовались не имеющие зрительного опыта котята и хорьки[2)–5)].

Рецептивные поля и свойства кортикальных клеток новорожденных животных

Новорожденные обезьяны сразу проявляют выраженную зрительную активность и способны к фиксации взгляда. Ответы корковых нейронов во многом сходны с ответа-

[*] В оригинале эта фраза звучит "Nature and nurture". — *Прим. перев.*



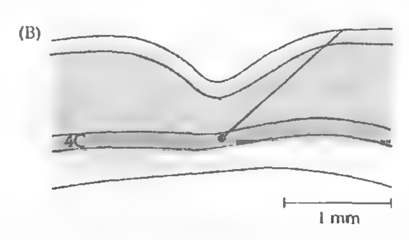


Рис. 25.1. (Рис. 25.1С см. на цветной вклейке после с. 640.) Колонки ориентации в отсутствие зрительного опыта. (А) Ось ориентации рецептивного поля клеток при прохождении электрода под косым углом к коре 17-дневного детеныша обезьяны, глаза которого были закрыты при помощи шва на второй день после рождения. Ориентация зрительных полей изменяется постепенно по мере пересечения колонок, что говорит о том, что нормальные колонки ориентации присутствуют в коре животного, не имеющего зрительного опыта. Серые точки — ипсилатеральный глаз; черные точки — контралатеральный глаз. (В) Черной точкой отмечено повреждение в конце проникновения электрода в слой 4. (С) Колонки ориентации, выявленные при помощи оптических методов у 14-дневного котенка, глаза которого были закрыты швом с рождения. Цветные полоски (справа) показывают ориентацию стимула. Стоит отметить, что уже имеются «вертушки».

Fig. 25.1. Orientation Columns in the absence of visual experience. (A) Axis orientation of receptive fields encountered by an electrode during an oblique penetration through the cortex of a 17-day-old baby monkey whose eyes had been sutured closed on the second day after birth. The receptive field orientation changes progressively as columns are traversed, indicating that normal orientation columns are present in the visually naive animal. Grey dots are from the universal eye, black dots from the contralateral eye. (B) The black dot marks the lesion made at the end of the electrode track in layer 4. (C) Orientation columns displayed by imaging in a 14-day-old kitten with lids sutured at birth. Colored bars (right) represent the orientation of the stimulus. Note that pinwheels are already present. (A and B from Wiesel and Hubel, 1974; C from Crair, Gillespie, and Stryker, 1998; micrograph kindly provided by M. C. Crair and M. P. Stryker.)

ми у взрослых животных. Например, запись сигнала от отдельных клеток первичной зрительной коры (V_1) показывает, что клетки не отвечают на диффузное освещение. Как и у взрослых животных, они лучше всего отвечают на полоски света или тени определенной ориентации, проецируемые на определенные области сетчатки[2]. В опытах с животными, не имевшими предыдущего зрительного опыта, диапазон ориентаций ничем не отличается от такового у взрослых животных. Рецептивные поля также организованы в антагонистические "on"- и "off"-зоны, управляемые обоими глазами. Более того, при проникновении в толщу коры в косом направлении при движении электрода наблюдается смена предпочтительных ориентаций в строго определенной последовательности[2] (рис. 25.1). На рис. 25.1 также показаны карты предпочтительных ориентаций с характерными «вертушками» (глава 21). Таким образом, очевидно, что все ориентации представлены в равной степени уже к моменту рождения[4].

Глазодоминантные колонки у новорожденных обезьян и котят

При рождении большинство клеток во всех слоях первичной зрительной коры уже получают управление от обоих глаз — некоторые в основном от правого, другие — от левого, и некоторые — в одинаковой степени от обоих. На рис. 25.2 показано распределение ответов нейронов всех слоев коры по отношению к глазному предпочтению у взрослых и ювенильных обезьян[2].

Степень доминирования может быть более наглядно выражена в виде гистограммы, где нейроны сгруппированы в семь категорий согласно частоте разрядов, с которой они отвечают на стимуляцию правого или левого глаза. Клетки в группе 1 и 7 на рис. 25.2 управляются только зрительными стимулами, предъявляемыми на один из глаз, в то время как группы со 2 по 6 отвечают в разной степени на сигналы от обоих глаз.

Гистограммы на рис. 25.2А и В выглядят похоже в пределах диапазона глазного пред-

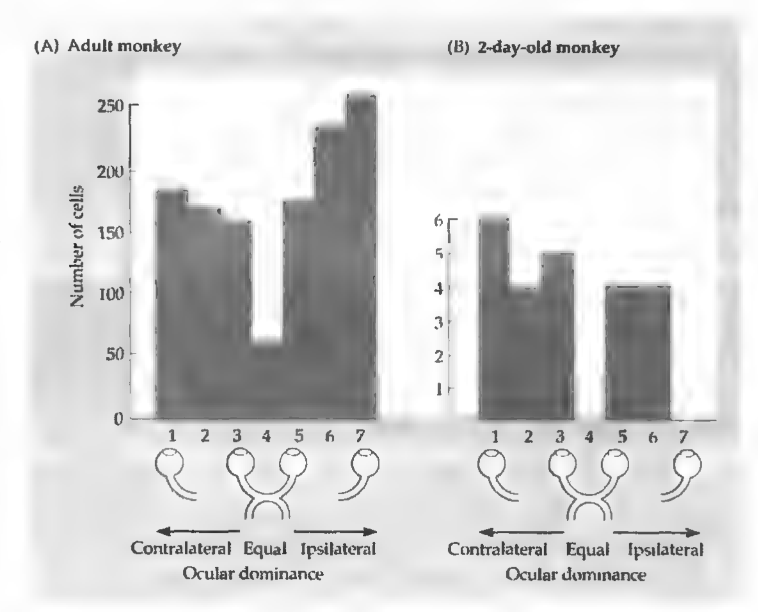


Рис. 25.2. Распределение глазного доминирования в зрительной коре новорожденной обезьяны. Клетки в группах 1 и 7 гистограммы управляются только одним глазом (ипсилатеральным или контралатеральным). Все другие клетки получают сигналы от обоих глаз. В группах 2, 3, 5 и 6 один из глаз доминирует. В группе 4 оба глаза оказывают одинаковое влияние. (А) Нормальная взрослая обезьяна, (В) Нормальная 2-дневная обезьяна.

Fig. 25.2. Ocular Dominance Distribution in the visual cortex of newborn monkey. Cells in groups 1 and 7 of the histograms are driven by one eye only (ipsilateral or contralateral). All other cells have input from both eyes. In groups 2, 3, 5, and 6, one eye predominates. In group 4, both eyes have equal influence. (A) Normal adult monkey. (B) Normal 2-day-old monkey. (After Wiesel and Hubel, 1974.)

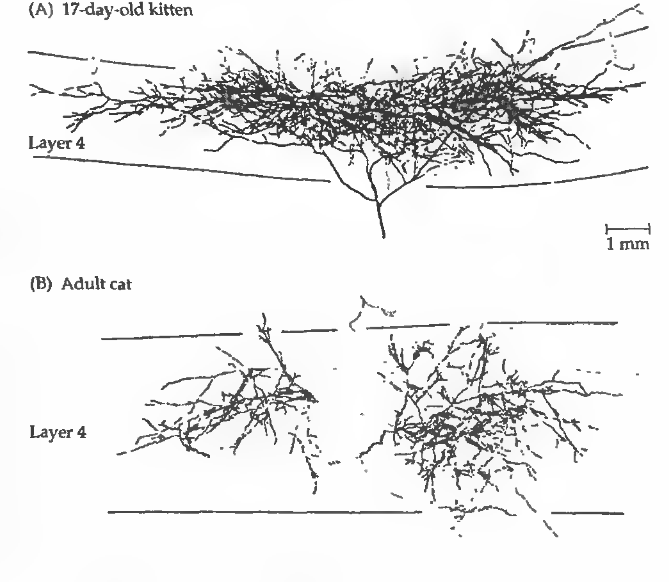


Рис. 25.3. Возрастная зависимость паттернов ветвления аксонов нейронов ЛКТ, заканчивающихся в слое 4, выявленных при введении пероксидазы хрена. (А) Аксон 17-дневного котенка. Аксон разветвляется на большой непрерывной территории слоя 4 зрительной коры. (В) У взрослой кошки аксон нейрона ЛКТ заканчивается на двух различных пучках, между которыми находятся неокрасившиеся волокна, идущие от другого глаза.

Fig. 25.3. Age Dependence of Branching Patterns of Axons from Lateral Geniculate. Nucleus ending in layer 4, labeled by injection with horseradish peroxidase. (A) Axon of a 17-day-old kitten. The axon spreads over a large uninterrupted territory in layer 4 of the visual cortex. (B) In the adult cat, the geniculate axon ends in two discrete tufts, interrupted by unlabeled fibers coming from the other eye. (After Wiesel, 1982.)

почтения. Однако они не отражают важной и поразительной разницы между новорожденными и взрослыми обезьянами, что касается свойств клеток слоя 4. В пределах этого слоя у новорожденных обезьян клетки управляются от обоих глаз, а после 6 недель развития — только от одного[6]. Вне слоя 4 кортикальные клетки новорожденных обезьян демонстриру-

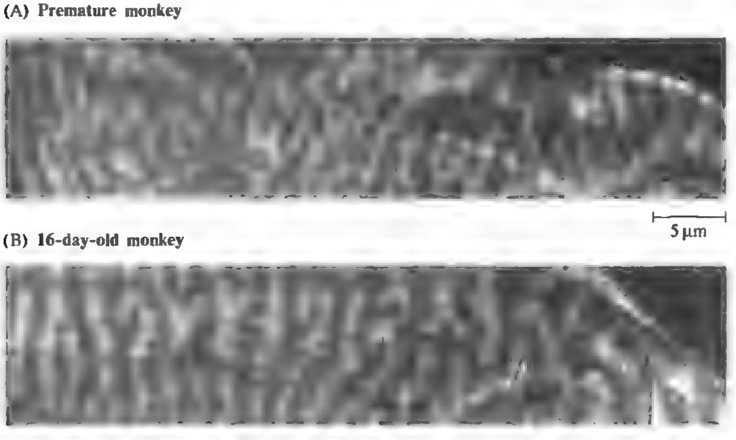


Рис. 25.4. Глазодоминантные колонки в слое 4 стриарной коры зрительно «наивной» обезьяны и более зрелого животного, которое имело зрительный опыт. (A) Обезьяна была рождена на 8 дней раньше срока, незрелой, при помощи кесарева сечения. Для проведения сечения использовались инфракрасные очки и операция проходила в полной темноте. На второй день жизни в правый глаз был введен радиоактивный пролин, после чего животное держали в темноте еще 7 дней. Авторадиография показывает слой 4 ипсилатеральной первичной зрительной коры. Уже различимы колонки глазного доминирования. (B) Подобное сечение через слой 4 16-дневного детеныша обезьяны, рожденного в срок и содержащегося в нормальных световых условиях. За 9 дней до опыта в правый глаз ввели радиоактивный пролин. Границы колонок глазного доминирования хорошо различимы.

Fig. 25.4. Ocular Dominance Columns in Layer 4 of the visual cortex in a visually naive monkey and in an older animal that had been exposed to light. (A) The monkey was delivered 8 days prematurely by cesarean section. Infrared night vision goggles were used in complete darkness for the delivery and for the injection of radioactive proline into the right eye 1 day later. The animal was maintained in complete darkness for 7 more days. The autoradiograph shows layer 4 of the ipsilateral primary visual cortex. Ocular dominance columns can be discerned. (B) Similar section through layer 4 in a 16-day-old monkey that had been born naturally and raised under normal lighting conditions. The right eye was injected with radioactive proline at 9 days. The boundaries of the ocular dominance columns are better defined. (After Horton and Hocking, 1996a; photographs kindly provided by J. Horton.)

ют ответы, аналогичные клеткам взрослых, за исключением того, что сигналы от некоторых клеток могут быть менее интенсивными или временно отсутствовать.

Формирование глазодоминантных колонок

В слое 4 Ле Вей, Визель и Хьюбель[7] (а также Ракич[12, 13], см. ниже) нашли важное и поразительное анатомическое различие между взрослыми и новорожденными. Причиной того, что клетки в пределах слоя 4 у новорожденных управляются обоими глазами заключается в том, что ветвления нервных окончаний волокон из ЛКТ значительно перекрывают друг друга (рис. 25.3 и 25.4)[8]. Отдельные аксоны, достигающие слоя 4 из ЛКТ, у новорожденных простираются на более широкий участок, чем у взрослых. В результате зоны, получающие информацию от каждого из глаз, перекрываются. Это отличается от паттерна строения этого слоя у взрослых, когда глазодоминантные колонки, отвечающие на сигналы от правого или левого глаза, имеют четко определенные границы. На рис. 25.4 показано, что глазодоминантные колонки могут быть обнаружены у обезьяны еще при рождении, хотя их развитие к этому моменту еще не закончено. Границы колонок у обезьян, не имеющих зрительного опыта, выглядят более смазанными и менее четко определены[9].

В течение первых 6 месяцев жизни животного аксоны из ЛКТ, направляющиеся в слой 4, подвергаются ретракции, что приводит к уменьшению ветвистости, напоминая «подрезанное» дерево (рис. 25.3). Таким образом, в пределах слоя 4 устанавливаются отдельные корковые области, каждая из которых управляется только одним глазом (рис. 25.5). Сравнимые изменения во время развития происходят и на предыдущем этапе зрительного пути, в латеральном коленчатом теле[10, 11]. Волокна зрительного нерва от обоих глаз врастают в ЛКТ, области их ветвления значительно перекрываются, до тех пор пока они не разделятся на отдельные слои. Постнатальное развитие колонок глазного доминирования и слоев ЛКТ происходит и у животных, выращенных в полной темноте. Эти морфологические наблюдения могут объяснить изменения в глазном доминировании,

Рис. 25.5. Ретракция окончаний аксонов ЛКТ в пределах слоя 4 коры в течение первых 6 недель жизни. На рисунке показано перекрытие сигналов, исходящих из правого (R) и левого (L) глаза, имеющееся с рождения, и последующее разделение в различные кластеры, связанные с соответствующими колонками глазного доминирования. Перекрытие при рождении больше у котят, чем у детенышей обезьян.

Fig. 25.5. Retraction of Lateral Geniculate Nucleus Axons ending in layer 4 of the cortex during the first 6 weeks of life. The figure shows the overlap of inputs from the right (R) and left (L) eyes present at birth and the subsequent segregation into separate clusters corresponding to ocular dominance columns. The overlap at birth is greater in kittens than in monkeys. (After Hubel and Wiesel, 1977.)

происходящие во время развития, и служить их количественной мерой.

«Пятна» в области первичной зрительной коры, выявленные при окрашивании на цитохромоксидазу, определяются анатомически уже к моменту рождения, что связано с нормальным развитием глазодоминантных колонок[9]. Полоски в зрительной области 2 (зона 18) четко различимы у новорожденных обезьян, не имеющих зрительного опыта (рис. 25.6).

Развитие строения коры в эмбрионе

Ракич[7, 12, 13], Хортон и Хокинг[9] показали, до какого уровня происходит развитие глазодоминантных колонок и «пятен» цитохромоксидазы к моменту рождения. В глаза обезьян на различных стадиях развития в матке были введены радиоактивные аминокислоты (глава 20) так, чтобы пометить клетки в области ЛКТ и их аксоны в пределах слоя 4 коры. Колонки и «пятна» также выявляли при помощи окраски на цитохромоксидазу (глава 21). На ранних стадиях развития зародыша в отсутствии каких-либо зрительных сигналов почти все зоны управления правого и левого глаза перекрывались. За несколько дней до рождения колонки глазного доминирования, «пятна», толстые и тонкие полоски зрительной зоны 2 были различимы и имели нормальные пропорции по отношению друг к другу.

У котят колонки глазного доминирования в зрительной коре четко разграничиваются только к возрасту около 30 дней[8]. Хорьки и сумчатые рождаются даже на более ранних стадиях развития и, следовательно, большая степень формирования зрительных сетей у них происходит в постнатальном периоде.

Генетические факторы в развитии зрительных сетей

Принципиальное утверждение этого параграфа не является большим сюрпризом: определенные свойства основных нейронных сетей формируются еще до того, как животное получает шанс что-либо увидеть. Другие свойства развиваются только в течение первой недели жизни. Ретракция аксонов ЛКТ в слое 4 является неким аналогом событий, происходящих при развитии нервно-мышечного синапса у новорожденных крыс: при рождении каждая концевая пластинка получает сигналы от множества мотонейронов, но в течение нескольких недель большинство аксонов подвергается ретракции, таким образом каждое мышечное волокно получает иннервацию только от одного мотонейрона[14] (глава 23).

В результате генетических дефектов в зрительной системе появляются интересные и

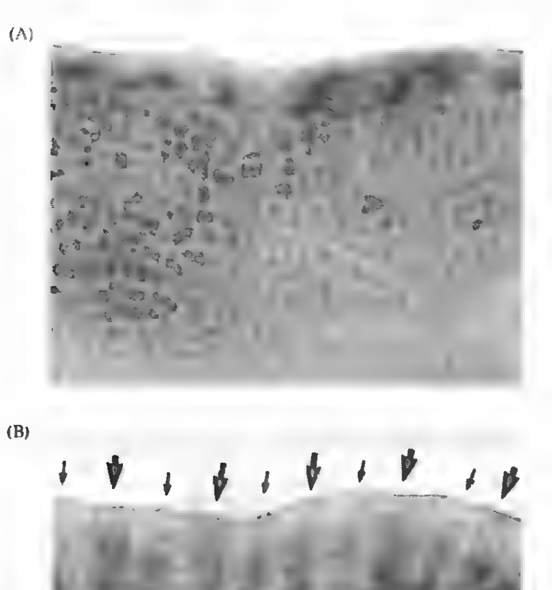


Рис. 25.6. Архитектура зрительной коры новорожденной обезьяны, не имеющей зрительного опыта (как на рис. 25.4А), рожденной кесаревым сечением на 8 дней раньше срока и содержащейся в темноте в течение 7 дней. (А) Окраска на цитохромоксидазу, выявляющая пятна в зоне 17. (В) Толстые и тонкие полоски в зрительной зоне 2, отмеченные толстыми и тонкими стрелками.

Fig. 25.6. Architecture of the Visual Cortex of Newborn Monkey without visual experience (as in Figure 25.4A), delivered by cesarean section 8 days prematurely and kept in total darkness for 7 days. (A) Cytochrome oxidase staining shows blobs in area 17. (B) Thick and thin stripes in visual area 2, labeled with thick and thin arrows. (After Horton and Hocking, 1996a; photographs kindly provided by J. Horton.)

важные системные аномалии. Например, цветовая слепота у мышей линии *reeler*, которые имеют аномальное строение зрительной коры[15, 16]. Также примером может служить дефект гена альбинизма у сиамских кошек и у альбиносов, который не только определяет цвет глаз животного через синтез меланина, но также способствует развитию косоглазия в результате систематических ошибок в соединениях между нейронами зрительной коры[17)–19]. В этой главе мы больше уделим внимания аномальному сенсорному опыту в ранние периоды жизни, и тому, как это может коренным образом изменить анатомию и физиологию центральной нервной системы на всю оставшуюся жизнь животного.

§ 2. Последствия аномального сенсорного опыта в ранние периоды жизни

В этом разделе описывается три типа экспериментов, большой частью выполненных впервые еше Хьюбелем и Визелем, когда животное лишали нормальных зрительных стимулов[6, 20]. Они изучали физиологические ответы нервных клеток и структуру зрительной системы после (1) закрытия век обоих глаз; (2) предотвращения развития образного зрения (form vision), при сохранном доступе света в глаз; (3) при нормальном попадании света и формирующемся образном зрении, но в условиях искусственно вызванного страбизма (косоглазия) с одной стороны. Эти манипуляции вызывали значительное нарушение в функции и анатомии коры. Особенностью работы Хьюбеля и Визеля является то, что все результаты являются хорошо воспроизводимыми, явными и впечатляющими.

Развитие слепоты после закрытия век

Когда веки одного глаза были сшиты вместе на протяжении первых двух недель жизни, обезьяны и котята продолжали развиваться нормально и использовали неоперированный глаз. Через 1–3 месяца, однако, когда открывался оперированный глаз, а нормальный закрывался, становилось очевидным, что животные были практически полностью слепы на оперируемый глаз. При этом котята ударялись о находящиеся вокруг предметы и падали со стола[6, 21], но не было обнаружено какого-либо значительного физиологического дефекта в оперированных глазах, зрачковый рефлекс оставался нормальным, как и электроретинограмма, которая представляет собой карту суммарной электрической активности

глаза. Сигналы от ганглионарных клеток сетчатки у депривированных животных ничем не отличались от нормальных, как и их рецептивные поля.

Ответы кортикальных клеток после монокулярной депривации

И хотя ответы клеток ЛКТ после монокулярной депривации практически не изменялись[22)], тем не менее большие изменения происходили в ответах кортикальных клеток[6, 7, 23)]. При регистрации электрической активности в зрительной коре было обнаружено очень мало клеток, которые управлялись глазом, подвергнутым депривации. Большинство из тех клеток, которые все же отвечали на стимуляцию этого глаза, имели аномальные зрительные поля. Ответы же клеток недепривированного глаза оставались нормальными. На рис. 25.7 показаны гистограммы глазного доминирования, полученные для котят и новорожденных обезьян, у которых один из глаз был закрыт на протяжении нескольких первых недель жизни.

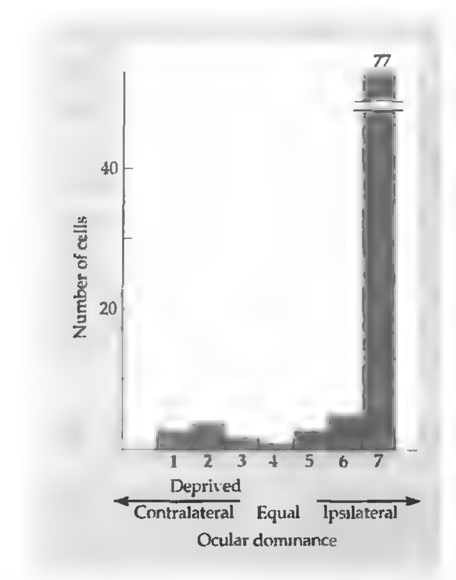


Рис. 25.7. Последствия закрытия одного глаза. Распределение глазного доминирования у обезьяны, правый глаз которой был закрыт с 21 до 30 дня жизни. Несмотря на то, что в течение последующих 4 лет обезьяна смотрела обоими глазами, большинство кортикальных нейронов остаются нечувствительными к сигналам из правого глаза.

Fig. 25.7. Damage Produced by Closure of Dne Eye. Ocular dominance distribution in a monkey whose right eye was closed from 21 to 30 days of age. In spite of subsequent 4 years of binocular vision, most cortical neurons were unresponsive to stimulation of the right eye. (From LeVay, Wiesel, and Hubel, 1980.)

Относительная значимость диффузного света и формы объектов для поддержания в норме ответов кортикальных клеток

Результаты экспериментов, описанных нами, говорят о том, что если один глаз не используется в полной мере на протяжении первых недель жизни, его влияние ослабевает и он становится неспособен управлять клетками зрительной коры. Такие значительные изменения вызываются сравнительно небольшой процедурой по закрытию век, без перерезки нервов. Каково же главное условия для поддержания в норме и дальнейшего развития нормальных корковых ответов? Может ли в этом помочь рассеянный свет?

Закрытие век уменьшает количество света, достигающего сетчатки, но не полностью исключает его. Таким образом, можно предположить, что только при помощи диффузного освещения можно заставить глаз нормально функционировать. Или для этого необходимо не просто наличие освещения, но и предметное зрение, которое может быть важным стимулом в предотвращении аномального развития корковых связей? Эти гипотезы были проверены в серии экспериментов, выполненных на новорожденных котятах. Пластиковый полупрозрачный щиток (напоминающий разрезанный шарик для настольного тенниса) помещался поверх роговицы. Он предотвращал возможность различать какие-либо предметы, однако пропускал свет. У всех этих котят развилась слепота на депривированный глаз[21)]. Более того, также уменьшалось количество кортикальных клеток, управляемых этим глазом. При этом не регистрировалось каких-либо изменений ни в ответах клеток ЛКТ, ни в клетках самой сетчатки.

Морфологические изменения в ЛКТ после зрительной депривации

Клетки ЛКТ кошки и обезьяны организованы в виде слоев, каждый из которых управляется преимущественно только правым или левым глазом (глава 20). У тех животных, у которых были обнаружены аномалии строения коры после закрытия век, клетки ЛКТ на первый

взгляд выглядели нормальными. Тем не менее было показано, что закрытие век вызывает в них значительные морфологические изменения: клетки становились заметно меньше, чем в слоях, управляемых другим, нормальным глазом[22)]. Уменьшение в размерах зависело от продолжительности закрытия век. К удивлению экспериментаторов клетки ЛКТ демонстрировали значительные морфологические изменения одновременно с небольшим функциональным дефицитом. Некоторые из работ дают основания полагать, что размер клеток в ЛКТ может отражать степень их ветвления в коре[24, 25)].

Морфологические изменения в коре после зрительной депривации

Морфологические последствия закрытия одного глаза наиболее хорошо были заметны в слое 4 первичной зрительной коры, где волокна из ЛКТ прерываются, образуя строго определенный паттерн ветвления[7, 26)]. Изменения в колонках глазного домииирования, возникающие вследствие закрытия век у обезьян, были выявлены при помощи авторадиографии коры после введения радиоактивных веществ в один глаз. После длительного закрытия век наблюдалось значительное уменьшение ширины колонок глазного доминирования, связанных с закрытым глазом. В то же самое время колонки, управляемые нормальным глазом, соответственно увеличивались в ширине по сравнению с тем, какими они должны быть у взрослых обезьян в норме. Уменьшение колонок глазного доминирования наглядно видно на рис. 25.8, где нормальные колонки можно сравнить с колонками животных, глаз которых был закрыт в возрасте 2 недель и оставался закрытым на протяжении 18 месяцев. Эти изменения говорят о том, что аксоны из ЛКТ, управляемые нормальным глазом, захватывают и удерживают территорию коры, управляемую более слабым, зрительно депривированным соседним глазом. Эти данные подтверждаются физиологическими наблюдениями по регистрации электрической активности клеток слоя 4. Почти все клетки получали управление только от недепривированного глаза. Некоторые свойства коры менее чувствительны к депривации. Так, например, энуклеация (удаление) одного или даже обоих глаз не вызывало изменений в распределении «пятен» в области V_1 и полос при окраске на цитохромоксидазу в области V_2.

Критический период чувствительности к закрытию век

При закрытии век одного глаза у взрослых кошек или обезьян не наблюдается каких-либо последствий[6, 7)]. Например, у взрослого животного, даже если глаз остается закрытым на протяжении более года, клетки в коре по прежнему получают нормальное управление от обоих глаз и имеют нормальную гистограмму распределения колонок глазного доминирования. Более того, даже если полностью удалить один глаз у взрослой обезьяны, структура слоя 4 остается нормальной, что можно видеть при помощи ауторадиографии и других методов окраски, даже в случае развития атрофии ЛКТ. Эти результаты говорят о значительной устойчивости к изменениям клеток слоя 4 у взрослых, по сравнению с изменениями, наблюдаемыми у незрелых животных.

Клетки коры обезьян имеют наибольшую чувствительность в течение первых 6 недель жизни[6, 7, 26)]. В течение любого периода на протяжении этих 6 недель, с максимумом в первую неделю жизни[27)], незначительные изменения в глазном предпочтении и колоночной архитектуре коры возникают даже тогда, когда глаз закрыт на протяжении всего нескольких дней. Затем на протяжении нескольких месяцев (вплоть до 12–16-го месяца жизни) требуется несколько недель, чтобы вызывать заметные изменения в гистограммах глазного доминирования или в ширине колонок слоя 4. После этого времени изменения не развиваются, даже если провести хирургическое удаление одного глаза.

Период наибольшей чувствительности к закрытию век у котят сужен до 4–5 недель после рождения[28, 29)]. На протяжении первых трех недель жизни закрытие одного глаза практически никак не влияет на формирование коры. Это и не удивительно, ведь глаза котят в норме закрыты в течение первых 10 дней. Однако в течение 4–5-й недели чувствительность к закрытию резко возрастает. Закрытие глаза в это время даже всего на 3–4 дня приводит к резкому уменьшению количества клеток, управляемых депривированным глазом. Эксперимент по сравнению животных одного помета показан на рис. 25.9. В данном случае закрытие глаза на протяжении 6 и 8 дней, начиная с 23-го и 30-го дня жизни (рис. 25.9А и В), приводило к такому же эффекту, как и монокулярная депривация на протяжении трех месяцев с момента

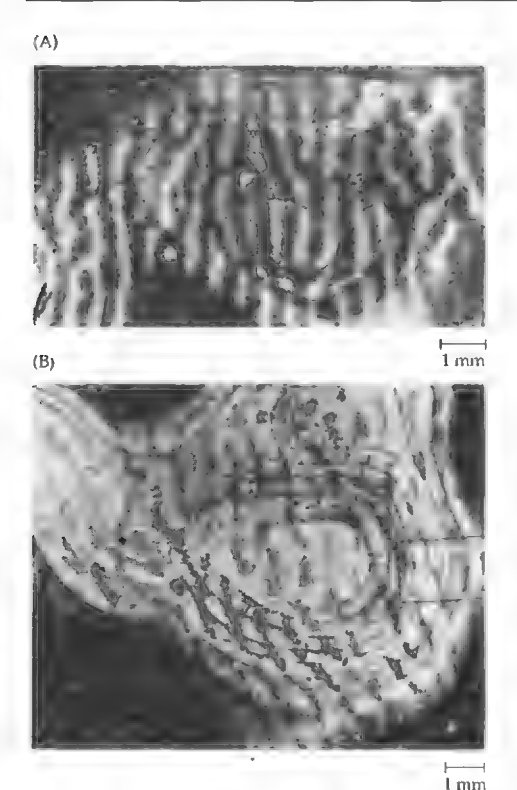


Рис. 25.8. Колонки глазного доминирования в слое 4 коры после закрытия одного глаза. (A) Нормальная взрослая обезьяна. В правый глаз 10 дней назад была введена радиоактивная смесь пролина и фукозы. В слое 4 можно видеть перемежающиеся светлые и темные полоски одинаковой ширины. Помеченные с помощью радиоактивных меток аксоны из ЛКТ в слое 4 правого полушария выглядят как мелкие белые гранулы, образующие колонки. Находящиеся между ними темные полоски связаны с другим глазом. Данное изображение представляет собой фотореконструкцию параллельных срезов слоя 4 с помощью авторадиографии. (B) Реконструкция слоя 4 у 18-месячной обезьяны, правый глаз которой был закрыт в возрасте 2 недель. Радиоактивная метка вводилась в нормальный глаз. Белые гранулы показывают колонки в слое 4, образованные недепривированным глазом. Они шире, чем в норме. Колонки, управляемые закрытым глазом (показано черным), уже, чем в норме. (C) Корковые разветвления аксонов ЛКТ, заканчивающихся в слое 5 коры котенка, один глаз которого был закрыт на протяжении 33 дней. Терминальное ветвление аксона ЛКТ депривированного глаза показывает значительное уменьшение количества веточек по сравнению с недепривированным глазом.

Fig. 25.8. Ocular Dominance Columns in Layer 4 after Closure of One Eye. (A) Normal adult monkey. The right eye had been injected with a radioactive proline-fucose mixture 10 days previously. Layer 4 displays alternating light and dark stripes of equal width. Radioactively labeled geniculate axons in layer 4 of the right hemisphere appear as fine white granules forming columns. Intervening dark bands correspond to the other eye. This image was made as a photomontage reconstruction from parallel sections of layer 4 with autoradiography. (B) Reconstruction of layer 4 in 18-month-old monkey whose right eye had been closed at the age of 2 weeks. Radioactive material was injected into the normal left eye. White grains demonstrate columns in layer 4 from the nondeprived eye, which are larger than normal. Columns supplied by the eye that had been closed (black) are narrower than normal. (C) Cortical arborization of labeled geniculate axons ending in layer 4 of a kitten in which one eye had been closed for 33 days. The terminal arborization of the geniculate axon from the deprived eye shows a dramatic reduction of branches compared to that from the nondeprived eye. (A and B from Hubel, Wiesel, and LeVay, 1977; C after Antonini and Stryker, 1993b.)

рождения. Чувствительность к закрытию век уменьшалась по мере прохождения критического периода и в конце концов исчезала к трем месяцам жизни (рис. 25.9C). Критический период, однако, может продлиться, если держать котят в темноте[30, 31]. При отсутствии зрительного опыта чувствительность к монокулярной депривации может быть обнаружена даже в возрасте 6 месяцев. Однако нет данных о том, что если котенка в течение непродолжительного времени подержать на свету (для получения зрительного опыта), то это предотвратит продление критического периода.

Восстановление во время критического периода

В какой степени возможно восстановление после депривации во время критического периода? Даже если депривированный глаз по-

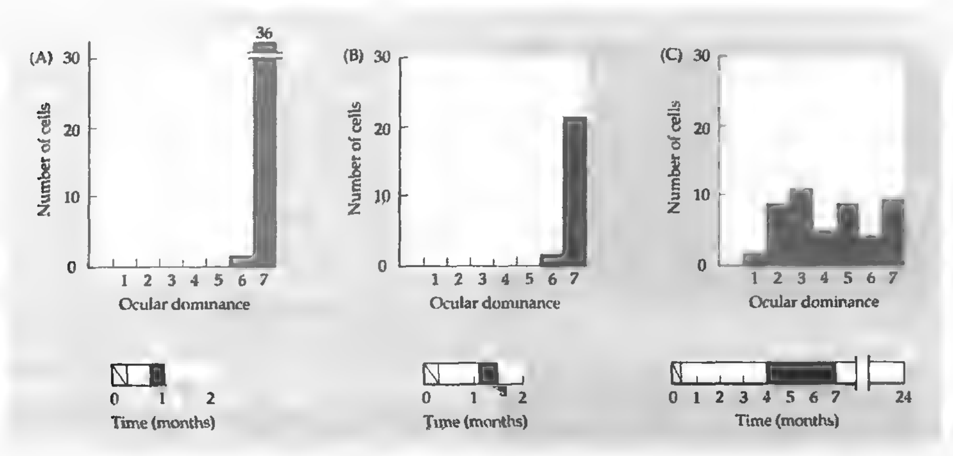
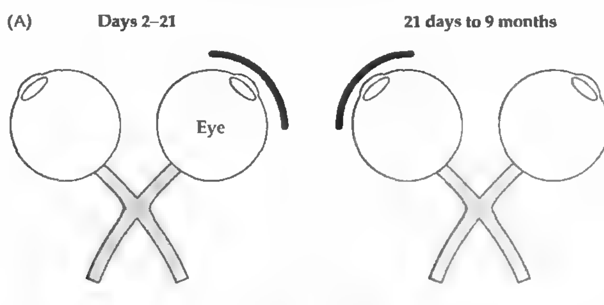


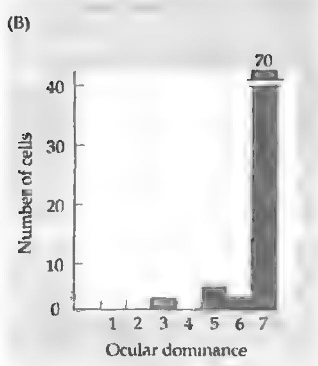
Рис. 25.9. Критический период у котят. На гистограммах показано глазное предпочтение в зрительной коре котят одного помета, у которых правый глаз был закрыт в разное время жизни. Период, в течение которого глаз оставался закрытым, показан внизу гистограммы. (A) Веки были зашиты на 6 дней в возрасте 23 дней. (B) Веки были зашиты на 9 дней в 30-дневном возрасте. (C) Правый глаз был открыт на протяжении первых 4 месяцев, затем закрыт на протяжении трех, а затем оставался открытым до достижения возраста 2 лет, когда и производилось исследование.

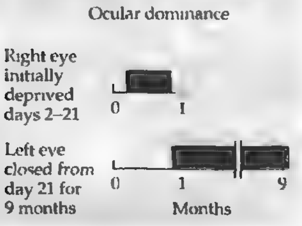
Fig. 25.9. Critical Period in Kittens. Histograms showing eye preference in the visual cortex of kittens that were littermates, in which the right eye was closed at different ages. The period during which the eye was closed is indicated under the histograms. (A) Eyelids sutured for 6 days at 23 days of age. (B) Eyelids sutured for 9 days at 30 days of age. (C) The right eye was open the first 4 months, then closed for 3 months, and then kept open until 2 years of age, when the recordings were made. (After Hubel and Wiesel, 1970.)

сле критического периода остается открытым на протяжении месяцев и лет, повреждение является перманентным, происходит лишь небольшое восстановление в редких случаях. Животное на всю жизнь остается слепым на один глаз, что сопровождается уменьшением колонок и асимметрией в гистограмме глазного доминирования. На животных с монокулярной депривацией проводились эксперименты, когда открывался ранее депривированный глаз и закрывался глаз, который раньше был нормальным. Эта процедура, называемая «обратное зашивание», приводила к значительному восстановлению зрения, но только в том случае, если она проводилась на протяжении критического периода[7, 32, 33]. Детеныши обезьян и котята не только начинали снова видеть на изначально депривированный глаз, но они также становились слепыми на другой глаз. Соответственно этим изменениям происходил сдвиг гистограммы глазного доминирования таким образом, что глаз, открытый после депривации, управлял бóльшим количеством клеток, чем глаз, который был открыт на протяжении первых недель и затем закрыт. Более того, анатомическое строение слоя 4, выявленное при помощи авторадиографии, также претерпевало соответствующие изменения: уменьшенные регионы, управляемые первоначально закрытым глазом, расширялись за счет регионов противоположного глаза. На рис. 25.10 показана гистограмма глазного доминирования и авторадиограмма коры обезьяны, у которой правый глаз был закрыт в возрасте 2 дней на протяжении трех недель. По прошествии этого времени депривированный глаз уже не мог управлять корковыми клетками и колонки, которые им управлялись, уменьшились. После этого правый глаз был открыт, а левый закрыт на протяжении следующих 9 месяцев. В конце этого периода все нейроны управлялись только первоначально депривированным правым глазом и зоны коры, контролируемые им, расширились.

Из этого эксперимента можно сделать несколько выводов: (1) на протяжении критического периода у нормального животного волокна из ЛКТ, направляющиеся в слой 4 коры, подвергаются ретракции, таким образом в коре формируются зоны, контролируемые только одним глазом; (2) закрытие одного гла-







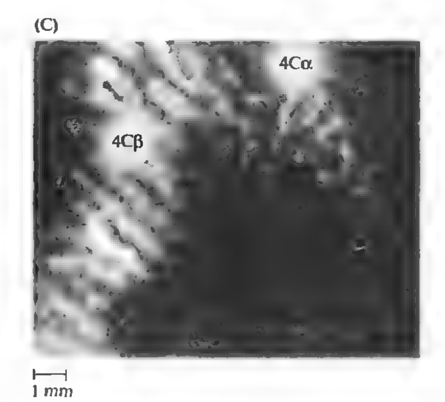


Рис. 25.10. Влияние обратного зашивания на распределение глазного доминирования и колончатую организацию коры у обезьян. (A) Были выполнены следующие процедуры: правый глаз был закрыт со 2-го до 21-го дня после рождения, после чего был открыт, а левый закрыт с 21 дня до возраста 9 месяцев. (B) Гистограмма глазного доминирования показывает, что почти все клетки получают управление исключительно от правого глаза, который был первично депривирован. Фактически ни одна клетка не получает управления от левого глаза. Таким образом, волокна, получающие управление от правого глаза, вернули себе те корковые клетки, которые потеряли в результате депривации. (C) Тангенциальный срез коры, проходящий через слои $4C\beta$ и $4C\alpha$. Окрашенные полоски, принадлежащие путям от правого глаза, распространились в слой $4C\beta$ несмотря на то, что этот глаз подвергся световой депривации на протяжении 19 дней. В течение первых дней колонки, получающие сигналы от правого глаза, уменьшились в размерах, однако после расширились. Восстановление после депривации в других слоях, таких как $4C\alpha$, не происходит так же хорошо.

Fig. 25.10. Effects of Reverse Suture on Ocular Dominance histogram and columnar organization in a monkey. (A) The procedure was as follows: The right eye was closed from days 2 to 21 after birth, after which it was opened while the left eye was closed from day 21 for 9 months. (B) The ocular dominance histogram shows that almost all cells were driven exclusively by the right eye, which had been initially deprived. Virtually no cortical cells were driven by the left eye. Had both eyes been kept open at 21 days, the histogram would be reversed. Accordingly, fibers driven by the right eye recaptured cortical cells they had previously lost. (C) Tangential section of cortex passing through layer $4C\beta$ and $4C\alpha$. The bands labeled by the right eye are expanded in layer $4C\beta$ even though it had been deprived of light for 19 days. During those first days, the columns supplied by the right eye had shrunk before expanding. Recovery did not occur equally well in other layers, such as $4C\alpha$. (After LeVay, Wiesel, and Hubel, 1980.)

за во время критического периода приводит к несимметричной ретракции; (3) смена депривированного глаза во время критического периода приводит к повышенному ветвлению (спраутингу (sprouting)) аксонов ЛКТ, в результате они вновь образуют связи с теми клетками, с которыми эта связь была потеряна (см. рис. 25.10)[34]. Если обратное заши-

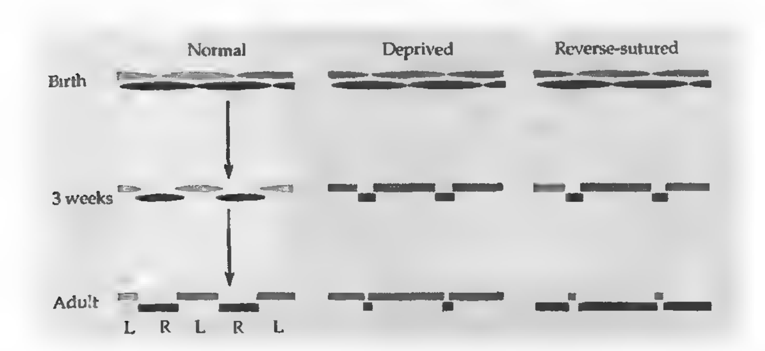


Рис. 25.11. Результат закрытия одного глаза. У нормальной обезьяны колонки глазного доминирования хорошо определяются в слое 4 коры к возрасту 6 недель. Закрытие век приводит к значительной ретракции волокон, идущих из ЛКТ, связанного с депривированным глазом, в то время как волокна, связанные с нормальным глазом, подвергаются меньшей ретракции, чем обычно, поэтому колонки этого глаза в слое 4 коры более широкие, чем у нормальных взрослых животных. После проведения обратного зашивания, если это сделано в критический период, изначально депривированный глаз может вернуть себе территорию в слое 4, которую он потерял.

Fig. 25.11. Summary of Effects of Eye Closure. In a normal monkey, ocular dominance columns have become well defined in layer 4 of the cortex by 6 weeks. Lid closure causes excessive retraction of geniculate fibers supplied by the deprived eye. Those supplied by the open eye retract less than usual, so their columns in layer 4 of the cortex are larger than normal in the adult. After reverse suture during the critical period, the initially deprived eye can recapture the territory it had lost in layer 4. (After Hubel and Wiesel, 1977.)

вание выполнить во взрослом состоянии, то оно не дает результатов. Например, у обезьяны, у которой обратное зашивание было выполнено в возрасте 1 года, колонки депривированного глаза, выявленные при окрашивании, так и остались суженными.

Однако концепция строго определенного, жесткого (hard-and-fast) критического периода является сильным упрощением. Эксперименты с обратным зашиванием, выполненные на обезьянах, дают основания полагать, что различные слои в стриарной коре могут развиваться с разной скоростью; критический период может уже закончиться для одного слоя, в то время как соседний еще способен к изменениям в структуре и функции (см. рис. 25.10С и 25.11).

§ 3. Необходимые условия для поддержания функционирования нервных связей в зрительной системе

На данном этапе напрашивается заманчивый вывод, что уменьшение активности в зрительных путях является основным фактором, который стремится нарушить нормальное функционирование корковых нейронов. Однако клетки коры активируются не в ответ на диффузное освещение, также вызывающее активность, а на определенные контуры и формы. Ниже в обсуждении мы стремимся показать, что для поддержания функционирования необходимы дополнительные факторы, гораздо более «тонкие» по своей природе. В частности, должно происходить взаимодействие между сигналами обоих глаз.

Бинокулярная депривация и роль конкуренции

Первым доводом против того, что уменьшение зрительной активности может привести к изменениям в работе нейронов, являются данные эксперимента, когда у детеныша обезьяны, новорожденного или рожденного путем кесарева сечения, закрывали сразу оба глаза[2, 6]. Исходя из предыдущего обсуждения, можно сделать предположение, что клетки в коре не будут управляться ни одним глазом. Однако, к удивлению, после бинокулярной депривации на протяжении 17 дней и дольше большинство корковых клеток выглядело полностью нормальными. Колонки ориентации имели строение, близкое к таковому у контрольной группы (рис. 25.1). Основным нарушением было то, что значительная часть клеток не получала бинокулярного управления (рис. 25.12). Кроме того, некоторые спонтанно активные клетки вообще не получали никакого управления, другим же для активности не требовался определенным обра-

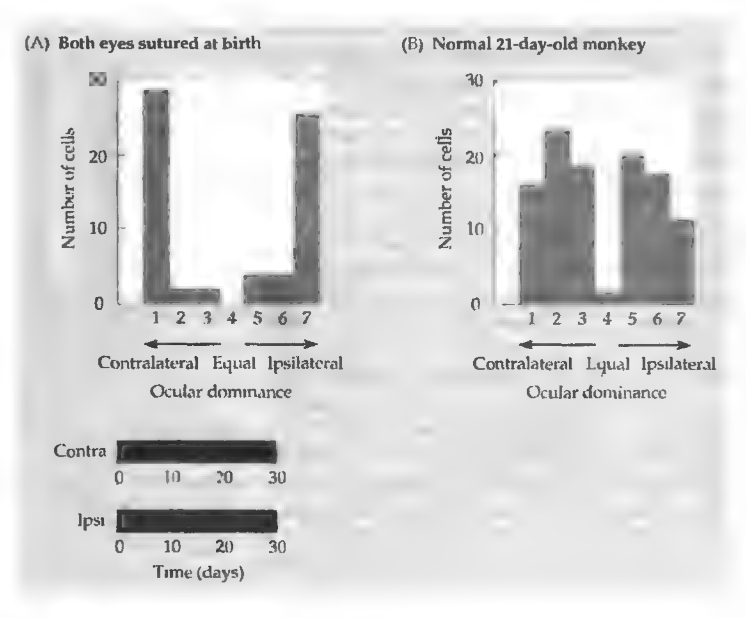


Рис. 25.12. Колонки зрительного доминирования после закрытия обоих глаз с рождения. (А) Обезьяна, на которой проводились исследования, была рождена посредством кесарева сечения, после чего веки обоих глаз были тотчас зашиты. Результаты были получены в возрасте 30 дней. Каждый из двух депривированных глаз все еще мог управлять клетками в зрительной коре. Рецептивные поля выглядели нормально, за исключением того, что некоторые клетки получали управление одновременно отобоих глаз. Время закрытия век показано внизу гистограммы. (В) Гистограмма глазного доминирования у нормальной обезьяны в возрасте 21 дня.

Fig. 25.12. Ocular Dominance after Closure of Both Eyes at Birth. (A) The monkey studied here was delivered by cesarean section, and the lids of both eyes were immediately sutured. Recordings were made at 30 days of age. Each of the two deprived eyes could still drive cells in the visual cortex. Receptive fields appeared normal, except that few cells were driven by both eyes. Closure time is indicated at the bottom of the histogram. (B) Ocular dominance histogram from a normal 21-day-old monkey. (After Wiesel and Hubel, 1974.)

зом ориентированный стимул. Тем не менее зоны коры, контролируемые обоими глазами, оставались равными в размерах, имея паттерн, аналогичный тому, что наблюдается у нормальных взрослых обезьян: в слое 4 клетки управлялись только одним глазом, четко определялись колонки при использовании авторадиографии или окраски на цитохромоксидазу. Бинокулярная депривация у котят приводила к сходным эффектам, за исключением того, что количество клеток, получающих бинокулярное управление, оставалось бóльшим[23)]. При этом также не происходило уменьшение ветвистости аксонов ЛКТ, направляющихся в слой 4 коры[35)]. В то же самое время клетки всех слоев в пределах ЛКТ подвергались атрофии (уменьшению в размерах примерно на 40 %).

Выводом из этих экспериментов является то, что некоторые, но не все негативные эффекты, вызванные закрытием одного глаза, уменьшались или предотвращались при закрытии обоих глаз. Таким образом, импульсы от обоих глаз являются как бы конкурирующими за представление в корковых клетках, и эта конкуренция нарушается при закрытии одного глаза из двух.

Эффекты страбизма (косоглазия)

Аномалии, описанные ранее, были вызваны зашиванием век или использованием прозрачных диффузоров, приводящих к потере предметного зрения. Исходя из данных о том, что у детей, страдающих косоглазием или страбизмом (cross-eyed, strabismus, squint), а также имеющих аномальное расположение глаз (wall-eyed), также развивается слепота, Хьюбель и Визель вызывали искусственное косоглазие у котят и новорожденных обезьян, при помощи подрезания глазных мышц[6, 36)]. В результате оптическая ось глаза отклонялась от нормальной. При этом освещение и паттерны стимуляции каждого глаза оставались без изменений.

Сначала результаты подобных опытов разочаровывали: после нескольких месяцев зрение в обоих глазах оперированного животного оставалось нормальным, и Хьюбель и Визель уже были готовы прекратить эту напряженную

серию экспериментов (личное сообщение). Тем не менее они смогли получить следующие данные о работе корковых клеток. Отдельные корковые клетки имели нормальные рецептивные поля и живо отвечали на определенным образом ориентированные стимулы. Однако почти каждая клетка отвечала только на стимуляцию одного глаза, некоторые управлялись правым, некоторые — левым, но практически ни одна — обоими глазами. Клетки, как обычно, были сгруппированы в колонки по отношению к глазному предпочтению и к ориентации оси зрительного поля[6, 37]. Как и ожидалось, возникала атрофия в области ЛКТ, хотя колончатая архитектура слоя 4 оставалась без изменений. Почти полное отсутствие бинокулярного представления в коре показано на гистограмме, полученной от обезьяны с искусственно вызванным косоглазием (рис. 25.13). Критический период для смещенного (из-за косоглазия) восприятия, в течение которого возникают данные изменения, близок к критическому периоду монокулярной депривации[38].

Эти эксперименты представляют собой пример, когда все обычные параметры освещения в норме: количество попадающего в глаз света и паттерн стимуляции. Единственным отличием от нормы является то, что свет не падает на корреспондирующие регионы двух сетчаток. Фактором, который, скорее всего, приводит к потере бинокулярной конвергенции проекций отростков ЛКТ в кору, является недостаток соответствия в импульсах от обоих глаз. То есть гомологичные рецептивные поля обоих глаз должны быть скоординированы, чтобы возбуждение происходило одновременно. Последующие эксперименты говорят в пользу такой идеи.

В течение первых трех месяцев жизни глаза котенка были закрыты непрозрачной пластиковой пластиной, которая перемещалась с одного глаза на другой каждый день таким образом, чтобы два глаза получили одинаковый зрительный опыт, но в разное время[36]. Результат был аналогичен данным экспериментов с искусственным косоглазием: клетки в основном управлялись либо правым, либо левым глазом, но не обоими. Поддержание нормальной бинокулярности зрения, таким образом, зависит не только от количества импульсов, но также и от надлежащего пространственного и временного соответствия активности в различных идущих к коре волокнах.

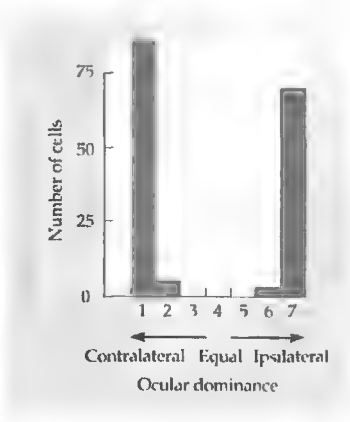


Рис. 25.13. Влияние косоглазия на формирование зрительного доминирования у обезьян. Глаза этой 3-летней обезьяны направлены в разные стороны, так как ей в возрасте 3 недель была проведена операция по подрезанию глазных мышц. Клетки коры получают управление либо от одного глаза, либо от другого, но не от обоих. Колонки глазного доминирования в слое 4 выглядят нормально для животного такого возраста.

Fig. 25.13. Effect of Strabismus on Monkey Ocular Dominance. The eyes in this 3-year-old monkey had faced in different directions since one eye muscle had been cut at 3 weeks of age. Cells are driven by one eye or the other, but not both. The ocular dominance columns in layer 4 appear normal in such animals. (After Hubel and Wiesel, unpublished, in Wiesel, 1982.)

Изменения в ориентационном предпочтении

Логичным продолжением является вопрос, изменится ли ориентационное предпочтение кортикальных нейронов у животных, находящихся в условиях, когда они видят образ только одной ориентации. Экспериментальный подход, включающий в себя также конкуренцию между глазами и депривацию, был использован Карлсоном, Хьюбелем и Визелем[39]. У новорожденной обезьяны были зашиты веки одного глаза. Животное содержалось в темноте, за исключением того времени, когда его голова помещалась в специальный держатель. В этом случае его голова фиксировалась строго вертикально и животное могло видеть вертикальные полоски оставшимся недепривированным глазом. Так как обезьяне всегда давали апельсиновый сок, когда она правильно устанавливала свою голову в держатель, она научилась быстро производить этот маневр. Таким образом, во время критического периода один глаз не получал никакой зрительной информации, а другой

видел только вертикальные полоски. После приобретения 57-и часов опыта в интервале между 12-м и 54-м днем с момента рождения регистрировался нормальный уровень корковой активности, когда клетки всех ориентаций были организованы как обычно, в виде колонок. Как и ожидалось, наблюдалось доминирование недепривированного (открытого) глаза.

При проведении тестов для определения ориентационного предпочтения были получены результаты, показанные на рис. 25.14. Оба глаза одинаково отвечали на горизонтально ориентированные линии, однако на вертикальные гораздо эффективнее отвечал левый (открытый) глаз. Возможным объяснением этого факта может служить то, что ни один глаз не видел горизонтальные полоски или контуры на протяжении критического периода. Следовательно, стимуляция горизонтальными линиями является для них аналогом бинокулярной депривации, то есть конкуренция по отношению к ним была равной. Что касается вертикальных полосок, здесь открытый глаз получил гораздо больше опыта, по сравнению с закрытым, и «захватил» часть клеток в колонках вертикальной ориентации, которые первоначально принадлежали депривированному глазу. Подобные же результаты были получены Бонхоеффером с коллегами на котятах, которым представлялись только полоски определенной ориентации[40].

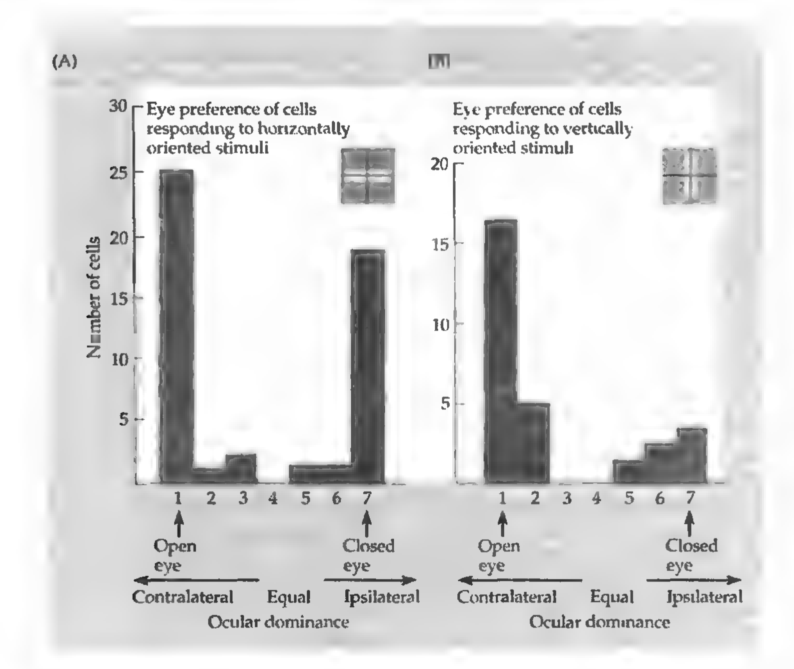
Критические периоды в развитии зрительной системы человека и их клиническое значение

Чувствительность котят и детенышей обезьян в ранние периоды жизни напоминает клинические наблюдения, выполненные на людях. Давно известно, что удаление непрозрачного хрусталика («катаракта») может привести к восстановлению зрения, даже если пациент был слепым на протяжении многих лет. И наоборот, катаракта может развиться у новорожденных или неполовозрелых детей, что часто приводит к слепоте. До экспериментов Хьюбеля и Визеля катаракты маленьким детям удаляли в позднем возрасте, когда они считались готовыми для этой операции. В результате формировалась перманентная слепота, без возможности к восстановлению[41]. В настоящее время катаракты у маленьких детей удаляются хирургическим способом как можно раньше, в критические периоды, что обеспечивает очень благоприятный прогноз восстановления зрения[42, 43].

Вторым клиническим применением полученных данных может служить известная медицинская манипуляция, используемая в прошлом для лечения детей с косоглазием и аномальным расположением глаз. Обычно на глаз, который видит хорошо, на долгий период ставится окклюзия, чтобы таким образом ребенок использовал более слабый глаз и разрабатывал его. Однако имеются данные, что это может привести к снижению остроты зрения депривированного глаза, в зависимости от возраста ребенка и времени окклюзии[44, 45]. Такая продолжительная окклюзия больше не используется в обычной медицинской практике. Клинические данные показывают, что наибольшей чувствительностью обладают дети первого года жизни, однако критический период может длиться и на протяжении нескольких лет.

Интересным является тот факт, что в глазодоминантных колонках, выявленных при помощи окраски на цитохромоксидазу слоя 4 зрительной коры у пациентов *postmortem*, обнаруживаются последствия монокулярной депривации в виде нарушений организации глазодоминантных колонок, подобно тому как это происходит у обезьян и котят. Хортон и Хокинг[46] изучали паттерны окрашивания в области первичной зрительной коры у детей, которые в возрасте 1 недели перенесли хирургическое удаление одного глаза из-за опухоли. После смерти в их головном мозге, как и ожидалось, окрашивание в пределах слоя 4С было однородным, вместо отдельной территории для каждого глаза, как это наблюдается у нормальных людей и у пациентов, перенесших удаление глаза во взрослом состоянии. Как и ожидалось, длительное (с двухлетнего возраста) косоглазие у пациента не выявило изменений в ширине колонок, как было обнаружено после смерти в возрасте 79 лет[47].

Третьим примером клинической важности подобных экспериментов является удлинение (elongation) глазного яблока, которое происходило при сшивании век у обезьян в неонатальном периоде. Подобное удлинение приводило к размытости изображения и к близорукости (миопии)[48]. Известно, что у детей также развивается близорукость, если веки мешают зрению или если нарушается прозрачность роговицы. Хотя есть некоторые доказательства того, что определенную роль в этом играют нейромедиаторы и активность клеток,



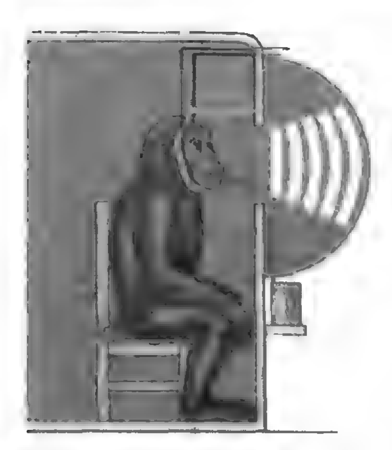
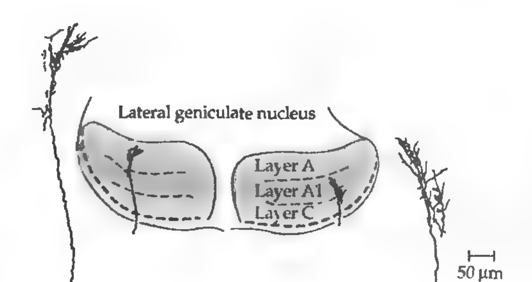


Рис. 25.14. Ориентационные предпочтения кортикальных клеток обезьяны с модифицированным зрительным опытом. Обезьяна содержалась в темной комнате. В возрасте 12 дней был закрыт правый глаз. Когда обезьяна правильно устанавливала свою голову в специальный держатель, она получала апельсиновый сок. При этом она видела своим левым глазом вертикальные полоски (специальный держатель для головы обеспечивал ее ровное положение). На протяжении в общей сложности 57 часов в возрасте между 12 и 54 днями один глаз видел только вертикальные линии, а другой не видел ничего. (А) Когда на экран проецировались горизонтально ориентированные световые стимулы, кортикальные клетки, управляемые как правым, так и левым глазом, отвечали одинаково хорошо. По этой диаграмме нельзя выявить признаков депривации, за исключением отсутствия бинокулярных клеток. (В) При использовании вертикально ориентированных стимулов левый глаз, который постоянно был открытым, управлял корковыми клетками более эффективно, чем правый. Диаграмма соответствует таковой после монокулярной депривации. Результаты позволяют предположить, что конкуренция за горизонтальные стимулы, которые не видел ни один глаз, была одинакова, а для вертикальных стимулов — различна (здесь преимущества имел левый, открытый глаз).

Fig. 25.14. Orientation Preferences of Cortical Cells in a monkey with altered visual experience. The monkey was kept in a dark room. At 12 days the right eye was closed. Whenever the monkey placed its head in a holder, it received orange juice. At that time it also saw vertical stripes with its left eye. (The head holder ensured that the head was not tilted.) For a total of 57 hours of exposure between 12 and 54 days, one eye saw only vertical lines, the other nothing. (A) When horizontally oriented light stimuli was shone onto the screen, cortical cells driven by the left eye or the right eye responded equally well. In this histogram no deprivation is apparent for horizontal orientation, except for a lack of binocular cells. (B) With vertically oriented stimuli, the left eye, which had been kept open, was much more effective in driving cortical cells. The histogram resembles that seen after monocular deprivation. The results suggest that competition was equal for horizontal stimuli that neither eye had ever seen, and unequal for vertical stimuli (favored by the left, open eye). (After Carlson, Hubel, and Wiesel, 1986.)



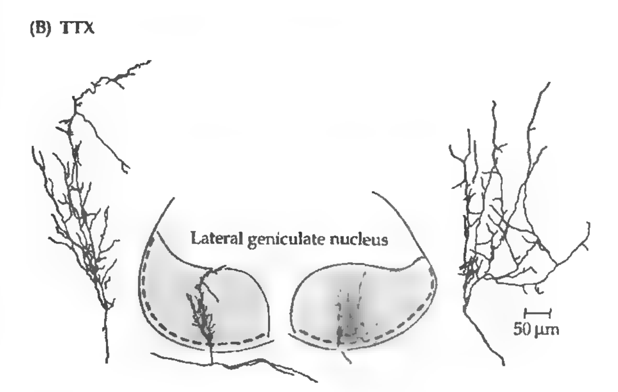


Рис. 25.15. Эффект подавления электрической активности тетродотоксином на ветвистость нервных волокон глазного нерва, заканчивающихся в ЛКТ. (A) У нормального котенка окончания зрительного нерва, помеченные при помощи пероксидазы хрена, ограничены пределом того слоя, где они в норме заканчиваются. (B) После применения тетродотоксина на протяжении 16 дней в эмбриональном возрасте, помеченные аксоны имеют гораздо большую ветвистость и не ограничены всего лишь одним слоем.

Fig. 25.15. Effect of Abolition of Electrical Activity by Tetrodotoxin on arborization of optic nerve fibers terminating in the lateral geniculate nucleus. (A) In a normal kitten the terminals of optic nerve fibers labeled with horseradish peroxidase are restricted to the single layer where they end. (B) After application of tetrodotoxin for 16 days during embryonic life, labeled axons show much larger arborizations that are not restricted to individual layers. (After Sretavan, Shatz, and Stryker, 1988.)

тем не менее механизмы удлинения глаза при закрытии век до сих пор остаются неизвестными.

§ 4. Клеточные и молекулярные механизмы депривационных изменений

Влияние импульсной активности на строение коры

Эксперименты со зрительной депривацией в ранние периоды жизни подняли две различные, но взаимосвязанные проблемы. Во-первых, каким образом проявляются эффекты импульсной активности на паттерны роста и ретракции отростков нейронов? Во-вторых, каким образом согласованная или несогласованная активность двух различных нервных путей определяет то, как они конкурируют за территорию и определяют ее границы?

В экспериментах, выполненных на котятах, была показана роль потенциалов действия в изменении архитектуры зрительной коры. Когда производится закрытие глаза или животное содержится в полной темноте, это не приводит к полному прекращению активности в зрительных путях. Нейроны продолжают спонтанно генерировать сигналы, и колонки глазного доминирования развиваются как отделенные друг от друга зоны в пределах слоя 4.

Эксперименты, выполненные Страйкером, Шатц и их коллегами[49, 50], показали, что этот, одинаково низкий уровень активности, идущий от обоих глаз, очень важен для нормального развития. Для доказательства этого они вводили тетродотоксин (ТТХ), который блокировал проведение потенциалов действия (глава 6), в оба глаза новорожденного котенка. Через несколько дней после удаления токсина проведение в зрительных путях от сетчатки к коре через ЛКТ восстанавливалось. Интересным результатом оказалось то, что после восстановления в латеральном коленчатом теле не происходило раз-

деления импульсов, идущих от разных глаз, в разные слои. Более того, клетки в слое 4 зрительной коры по-прежнему управлялись обоими глазами, как у новорожденного животного, и колонки глазного доминирования, выявленные методом авторадиографии, имели неонатальный паттерн: они сильно перекрывались и не имели четких границ. Таким образом, при полном отсутствии активности волокна из ЛКТ не могут подвергаться нормальной ретракции в слое 4 коры (рис. 25.15 и 25.16).

Влияние закрытия век на формирование глазодоминантных колонок может сильно меняться, если заблокировать активность клеток коры при помощи ТТХ. Например, проводили введение ТТХ на протяжении нескольких дней в зрительную кору котенка во время критического периода развития при депривации одного глаза[51]. После удаления ТТХ кортикальные клетки продолжали отвечать на стимуляцию обоих глаз, хотя один глаз был депривирован. Также в отсутствие активности не происходила ректракция отростков. Вместо использования ТТХ Страйкер с коллегами применяли фармакологические агенты, избирательно ингибирующие корковые нейроны, но не блокирующие активность в афферентных волокнах, идущих из ЛКТ. Полученные ими результаты в опытах с одновременной монокулярной депривацией дают основания полагать, что активность постсинаптических клеток определяет, возникнет ли ретракция после проведения монокулярной депривации[52]. Таким образом, важным является не просто наличие исходящей из глаз активности.

Синхронизованная спонтанная активность при отсутствии стимуляции во время развития

Эксперименты с тетродотоксином показывают, что для ретракции аксонов необходимо, чтобы по зрительным путям передавалась активность в виде потенциалов действия. Без этой фоновой активности аксоны остаются разветвленными в нескольких слоях ЛКТ и пересекают границы глазодоминантных колонок в коре. Итак, как мы уже видели, бóльшая часть развития нервной системы проходит еще до момента рождения. В темноте утробы матери, еще до того, как котенок или детеныш обезьяны что-то увидят, и даже

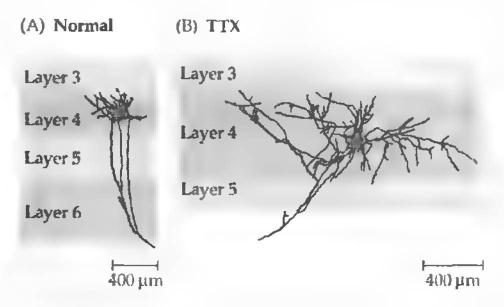


Рис. 25.16. Увеличение ветвистости волокон ЛКТ, заканчивающихся в слое 4 зрительной коры, после аппликации тетродотоксина в оба глаза. (А) Нормальная ветвистость помеченных аксонов из ЛКТ в слое 4 (в возрасте 30 дней). (В) Помеченные аксоны ЛКТ котенка, у которого проводили аппликацию тетродотоксина в оба глаза на протяжении 12 дней (возраст животного — 29 дней). Аксоны этого нейрона покрывают гораздо более широкую область в коре.

Fig. 25.16. Increased Arborization of Lateral Geniculate Fibers ending in layer 4 of visual cortex after application of tetrodotoxin to both eyes. (A) Normal arborization of a labeled geniculate axon in layer 4 (30-day-old animal). (B) Labeled geniculate axon in a kitten in which tetrodotoxin had been applied to the eyes for 12 days (29-day-old animal). The axons of this neuron cover a much larger area of cortex. (After Antonini and Stryker, 1993a.)

еще до того, как фоторецепторы начнут функционировать, уже можно различить отдельные слои в ЛКТ и колонки в коре. Означает ли это, что раннее развитие происходит без активности потенциалов действия, или какая-то собственная импульсная активность внутри системы управляет этим развитием?

Мафей с коллегами продемонстрировали, что синхронные разряды потенциалов действия распространяются вдоль глазного нерва уже в матке[53]. Были многочисленные дискуссии по поводу того, каким образом эта активность может возникать и какую роль она может играть в формировании согласованных полей иннервации.

То, что имеются периодические, синхронизованные волны активности в соседних ганглиозных клетках, было показано Майстером, Байлором и их коллегами в сетчатках, выделенных у незрелых хорьков и плодов котят[54]. Сетчатка помещалась в камеру, в которой находился 61 электрод. В записях с каждого электрода можно было идентифицировать разряды до четырех различных ганглиозных клеток. В этих опытах было выявлено, что определенный паттерн активности распространяется по сетчатке от одной

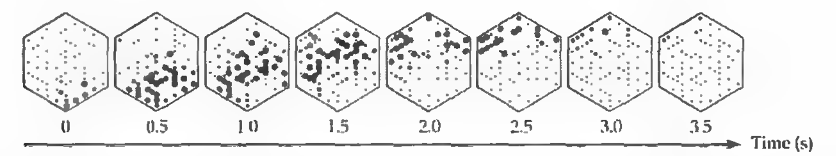


Рис. 25.17. Волны импульсной активности, распространяющиеся вдоль изолированного препарата сетчатки новорожденного хорька. Изолированная сетчатка была помещена на матрицу регистрирующих электродов. Расположение каждого из 82 нейронов показано в виде маленькой черной точки. Электрически активные нейроны показаны в виде больших черных пятен, размер которых пропорционален частоте импуьсации. Каждый кадр представляет собой усредненную нейронную активность за 0,5 секунды. На протяжении восьми кадров (3,5 с) потенциалы действия начинаются в области одной маленькой группы клеток и распространяются на всю сетчатку. Вскоре после прохождения первой волны начинается вторая, затем еще одна, каждый раз распространяясь в разных направлениях. На этом этапе развития фоторецепторы хорька еще не способны отвечать на свет.

Fig. 25.17. Wave of Impulse Activity Spreading across Isolated Retina of a neonatal ferret. The isolated retina was placed on recording electrodes, embedded in a regular array in the dish. The position of each of 82 retinal neurons is represented by a small black spot. Electrically active neurons are marked by larger black spots, the sizes of which are proportional to the firing rates. Each frame represents the activity averaged over successive 0,5 s intervals. During the time represented by the eight frames (3,5 s), action potentials begin with one small group of cells and spread slowly across the retina. A new wave begins shortly after, and then another, each spreading in a different direction. At this stage of development, photoreceptors in the ferret are not responsive to light. (After Meister et al., 1991.)

ганглиозной клетке к другой. Пример показан на рис. 25.17. Маленькими точками показано расположение электродов, большими черными точками отмечены места разрядов потенциалов действия, размер точки показывает частоту разрядов. Расстояние между кадрами составляет 0,5 с. Волна активности распространяется вдоль сетчатки на протяжении примерно 3 секунд. Обычно такие волны повторяются через определенные периоды, разделенные интервалами примерно в 2 секунды. Вонг[55)] сообщил о схожем волноподобном распространении кратковременных изменений в концентрации внутриклеточного кальция и предположил, что это может играть роль в синхронизации электрической активности. Имеются свидетельства, что холинэргические нейроны, звездчатые амакриновые клетки и имеющиеся между клетками электрические контакты играют роль в генерации координированной активности ганглиозных клеток незрелой сетчатки[56, 57)].

Однако до сих пор остается неизвестным, каким образом синхронизованная активность в одном глазу приводит к разделению идущих от него волокон зрительного нерва в слоях ЛКТ и препятствует перекрытию этих слоев.

Клеточные механизмы пластичности соединений

Для того, чтобы проверить, каким образом активность влияет на рост и ретракцию нервных отростков, было проведено много экспериментов на культурах нейронов позвоночных и беспозвоночных. Например, серии потенциалов действия, вызванные электрической стимуляцией с разной частотой, как было показано, приводят к значительной ретракции отростков, которые затем снова отрастают. Более того, этот эффект зависел не только от частоты и продолжительности серий, но и от молекулярного окружения, в котором происходил рост нейронов, а также от стадии их роста. В главе 23 дается обзор возможных механизмов того, как электрическая активность может влиять на рост отростков.

Эксперименты с искусственным косоглазием показывают, что для того, чтобы соединения между нейронами поддерживались на функциональном уровне, нейроны должны каким-то образом определять, какой из двух входящих сигналов находится в фазе, а какой — нет. Регистрации сигналов от кортикальных нейронов показывают, что нейроны способны отвечать со значительно большей амплитудой на два исходящих синаптических сигнала, которые поступают с определенной синхронностью[58)]. Каким образом это может привести к тому, что в результате одни нервные окончания остаются, а другие подвергаются ретракции, остается неизвестным.

Роль трофических веществ в поддержании нейронных связей

Отдельным направлением исследований является оценка того, каким образом трофические вещества, секретируемые постсинаптически-

ми клетками-мишенями, участвуют в поддержании нейронных связей (глава 23). Мафей с коллегами первыми показали в своих экспериментах, что нейротрофины, такие как ФРН (фактор роста нерва, NGF, nerve growth factor) и МНФ (мозговой нейротрофический фактор, BDNF, brain-derived neurotrophic factor), могут предотвращать эффекты монокулярной депривации в развивающейся зрительной системе крыс. Их результаты дают основания предполагать, что волокна ЛКТ конкурируют за факторы роста[59, 60].

Предположение авторов заключалось в том, что аксоны, не получая достаточного количества факторов роста от клеток мишеней, теряют с ними связи и подвергаются ретракции, как это происходит в других системах (глава 23). В связи с этим был проведен ряд опытов, в которых в коре крысы создавали высокую или избыточную концентрацию ФРН либо при помощи непосредственного введения, либо при помощи секреции из имплантированных специально культивированных шванновских клеток. В этих условиях монокулярная депривация больше не приводила к уменьшению размера колонок, однако кортикальные клетки по прежнему получали управление от обоих глаз. Введение антител к ФРН предотвращало эти эффекты. Более того, в нормально развивающейся зрительной системе антитела к ФРН вызывали уменьшение клеток в размерах и продлевали критический период, как должно происходить в случае блокады нормального действия трофических факторов и ФРН[61].

Хотя постепенно появляется все больше информации о локальных различиях в молекулярном окружении и о некоторых свойствах самих нейронов, до настоящего времени не существует полного и обстоятельного объяснения механизмам критического периода и пластичности на молекулярном уровне. Таким образом, мы пока не можем объяснить, почему соединения в зрительной коре являются более уязвимыми, чем в сетчатке или в спинном мозге.

Разделение сигналов без их конкуренции

В экспериментах, описанных нами до сих пор, основным принципом было то, что два глаза конкурируют друг с другом за связи и территорию в ЛКТ и в слое 4 первичной зрительной коры, исходно имея примерно равные возможности. Ракич с коллегами использовали другой подход для изучения того, как соседние группы клеток с хорошо определенными свойствами распределяют свои окончания и определяют свои мишени в процессе развития без конкуренции друг с другом[62].

Как мы уже писали выше, крупноклеточная (М, magnocellular) и мелкоклеточная (Р, parvocellular) системы располагаются в различных слоях ЛКТ и зрительной коры. При окраске отдельных аксонов М и Р клеток по мере того, как происходит их рост в ЛКТ во время развития, было показано, что аксоны извне приходят строго в М и Р слои, где они образуют характерные неперекрывающиеся паттерны ветвления. М волокна заканчиваются только в слоях 1 и 2 ЛКТ, а Р волокна — в слоях 3, 4, 5 и 6 (рис. 25.18), без перекрытия.

Таким образом, когда два глаза образуют свои связи, можно предположить, что конкуренция играет основную роль в разделении поступающей от них сходной информации об окружающем мире. На самом деле М и Р системы переносят абсолютно различные виды информации. Их соединения (подобно тем, что происходят при образовании пятен и полосок в зрительной зоне 2)[46] образуются по другим принципам, в которых конкуренция играет далеко не ведущую роль. Другим примером связей, которые образуются без участия конкуренции, является развитие карт ориентации в зрительной коре котенка[63]. (Стоит отметить, что результаты подобного рода укрепляют нашу уверенность в том, что не все, что происходит в нервной системе, или даже на рынке может быть списано на простую конкуренцию.)

§ 5. Критические периоды развития слуховой системы

Результаты, полученные при изменении восприятия зрительной информации у котят и незрелых детенышей обезьяны, имеют большое количество приложений для понимания функционирования нервной системы. Интересным примером является то, как происходит адаптация слуховой системы во время ее критических периодов, что показано в экспериментах Кнудсена и его коллег на амбарной сове (barn owl)[64]. Ранний слуховой опыт формирует особенности настройки нейронов

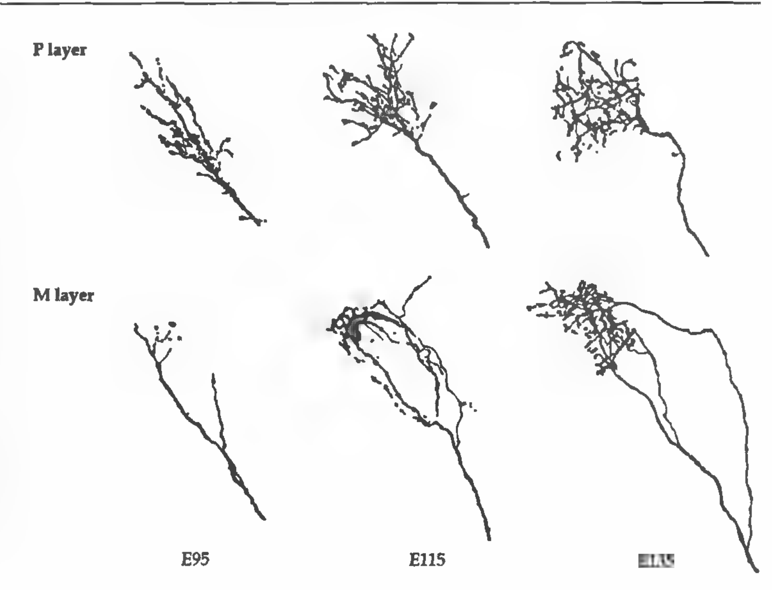


Рис. 25.18. Отсутствие конкуренции за территорию между крупно- и мелкоклеточными аксонами клеток сетчатки и ЛКТ. Помеченные нервные окончания волокон зрительного нерва в слое М и Р ЛКТ обезьяны продолжают расти на протяжении с 95 до 135 дня эмбриональной жизни (с Е95 до Е135). С самого начала развития аксоны ограничены только своими собственными слоями и не распространяются в соседние слои ретракции. Таким образом, М и Р волокна не конкурируют за пространство.

Fig. 25.18. Absence of Competition for Territory by Magno- and Parvocellular Retinogeniculate Axons. Labeled optic nerve fibers ending in M and P layers of monkey lateral geniculate nucleus continue to grow during embryonic days 95 to 135 (E95 to E135). From the outset, axons are confined to their appropriate layers without showing spread into adjacent layers of retraction during development. Thus, M and P fibers show no competition for space. (After Meissirel, et al., 1997.)

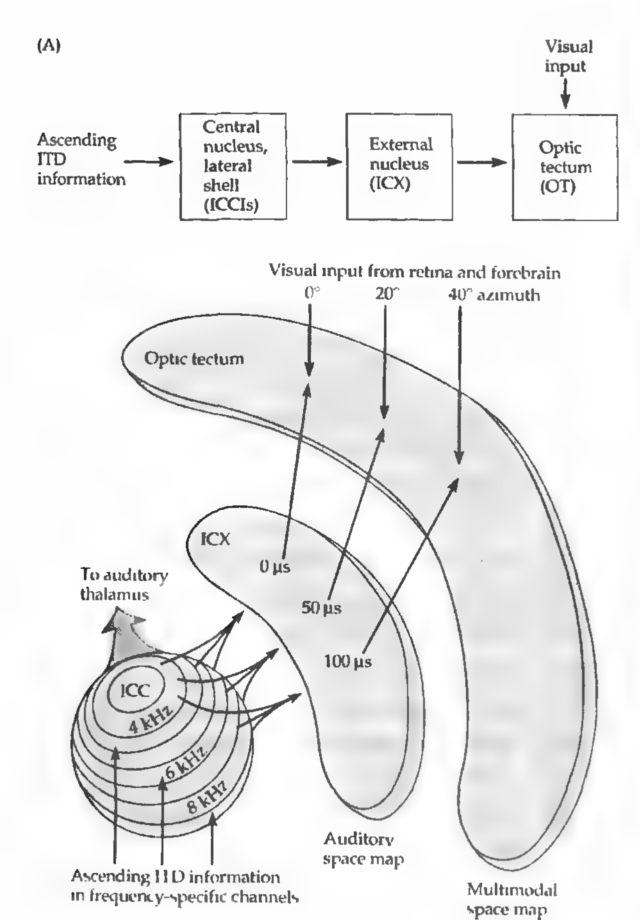
четверохолмия амбарной совы в зависимости от частоты[65]. Следующий пример показывает, как изменения в восприятии зрительной информации в ранние периоды жизни могут повлиять на представление слуховой системы в головном мозге амбарной совы.

Слуховой и зрительный опыт у новорожденных амбарных сов

Сова способна поворачивать голову точно в направлении того места, откуда раздается звук (так как она должна ловить слабо пищащую мышь). Горизонтальная локация звука осуществляется при помощи измерения разницы во времени между правым и левым ухом (interaural time difference) — то есть по задержке между звуковыми волнами, поступающими сначала в одно ухо, а потом — в другое. (Сова также может принимать во внимание интенсивность звука в обоих ушах для оценки вертикальной позиции: асимметрично расположенные группы перьев на ее морде отражают звук, идущий сверху, в одно ухо, а снизу — в другое.)

Другой возможностью для совы определить положение и траекторию движения мыши является зрение. На рис. 25.19А показано, что у нормальной взрослой совы нейронные карты пространства для зрения и слуха (neural maps for visual and auditory space) согласованы в одном слое зрительной области четверохолмия (tectum), которая соответствует зоне верхнего двухолмия у млекопитающих. Подобное картирование осуществляется при помощи измерения ответов отдельных нейронов четверохолмия на звуки, идущие от различных участков, и световые стимулы, предъявляемые в различных участках зрительного поля.

В серии экспериментов совят выращивали со смещенными на 23 градуса вправо или влево зрительными полями, для чего на глаза им помещались специальные призмы (рис. 25.20А)[66, 67]. Это сдвигало изображение зрительного поля на сетчатке и, следовательно, его проекцию в четверохолмии таким образом, что уже не было согласования между зрительной и слуховой картами (рис. 25.20В, С). На протяжении следующих 6–8 недель происходило смещение слуховой пространственной карты, и она снова соответствовала зрительной карте. Пластичность в критический период, таким образом, позволяла проводить «тонкую настройку» функций коры в результате приобретаемого совой опыта и знаний об окружающем мире. В результа-



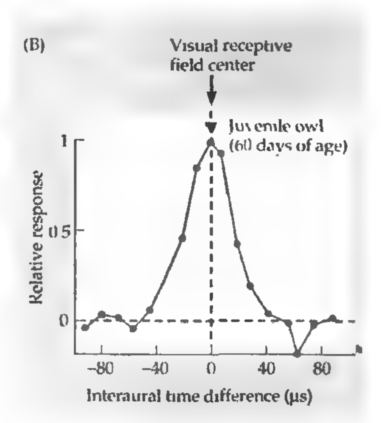
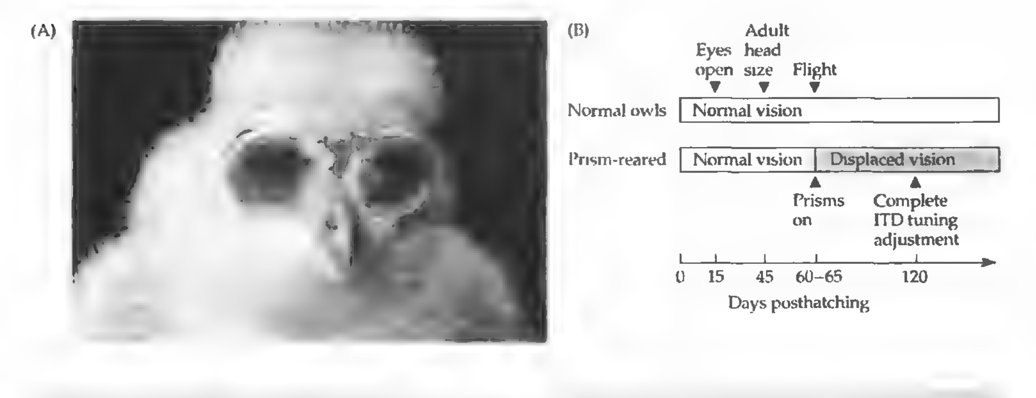
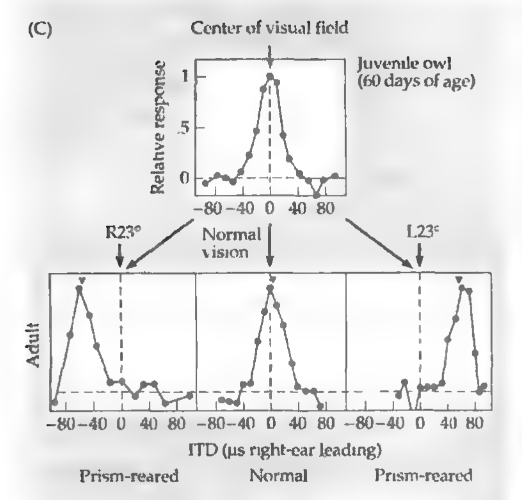


Рис. 25.19. Наложение друг на друга слуховой и зрительной карт пространства в области четверохолмия амбарной совы. (А) Восходящий слуховой путь, направляющийся к зрительным холмикам. Слуховые нейроны внутреннего (ICC) и наружного (ICX) ядер нижнего холмика имеют тонотопическую организацию. Они проецируют отростки в области зрительных холмиков в определенной последовательности. Слуховая карта пространства зависит от различий во времени между поступлением звуков в оба уха. Слуховые и зрительные карты пространства тесно связаны друг с другом. Таким образом, нейроны, сигналы которых регистрируются в области, отмеченной как «0 μs (0 мкс)», отвечают на зрительные и слуховые стимулы, расположенные прямо перед совой. ITD — интерауральная разница во времени. (В) График ответов на интерауральную разницу во времени, полученный у молодой совы в возрасте 60 дней. Различие во времени между двумя звуками показано по оси x (слева направо). Нейроны, которые отвечают на интерауральную разницу в 0 мкс, лучше всего реагируют на стимулы, находящиеся непосредственно перед животным, и связаны с рецептивным полем, расположенным в центре зрительного поля. Звуки, идущие слева или справа, достигают ушей совы с задержкой, активируя нейроны, имеющие различные кривые ответов, пики которых отличаются от 0 мкс и которые также согласованы со зрительными стимулами.

Fig. 25.19. Superimposition of Auditory and Visual Space Maps in the optic tectum of barn owl. (A) Ascending auditory pathway to the optic tectum. Auditory neurons in the internal (ICC) and external (ICX) nuclei of the inferior colliculus are tonotopically arranged. They project to the optic tectum, maintaining an orderly sequence. The auditory space map depends on the time difference of the arrival of sounds in the two ears. Auditory and visual space maps are in register with each other. Thus, neurons that one records from the position marked "0 μs" respond to visual and auditory stimuli that are directly in front of the bird. ITD = interaural time difference. (B) Graph of responses to interaural time differences plotted in a juvenile owl 60 days of age. The time difference between the two sounds indicates the position to the left or to the right. The neuron that responds to the time value of a 0 μs interval in interaural time difference fires best when the stimulus is directly in front of the animal, corresponding to a receptive field position at the center of the visual field. Sounds coming from the left or the right of the owl reach the ears with a delay, activating neurons with different response curves, peaks being displaced from 0 μs and in register with optical stimuli. (A after Knudsen, 1999a; B after Feldman and Knudsen, 1997.)





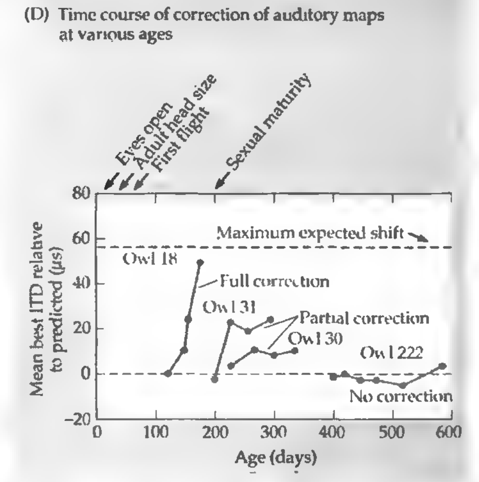
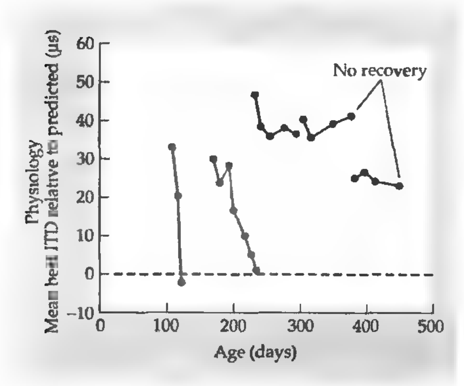


Рис. 25.20. Сдвиг слухового рецептивного поля после помещения на глаза сов призм во время критического периода. (A) Совята с очками, состоящими из призм, вызывающих смещение зрительного поля на 23 градуса вправо (или влево, в зависимости от очков). (B) Стадии развития, когда призмы помещались на глаза совят. (C) Аудиометрические кривые, показывающие ответы на звуки, имеющие различный интерауральный временной интервал. У нормальной молодой совы в возрасте 60 дней ответы нейронов аналогичны представленным на рис. 25.19: интерауральная разница во времени (ITD), равная 0 мкс, представляет центр зрительного поля. При выращивании животного с данными призмами происходило смещение кривых. Зрительные рецептивные поля смещались вправо или влево на 23 градуса. Теперь наибольшие ответы слуховых нейронов регистрировались с той ITD, которая соответствовала смещенным зрительным полям. При этом вновь восстанавливалось соответствие между зрительной и слуховой картами. (D) Временной ход сдвига слуховых кривых у 3 незрелых совят. У взрослой совы (сова 222) не происходило какой-либо коррекции.

Fig. 25.20. Shift of Auditory Receptive Fields after application of prisms during the critical period. (A) Baby owl with glasses consisting of prisms that offset its visual field by 23° to the right (or to the left depending on the spectacles). (B) Stages at which prisms were placed on owl eyes. (C) Tuning curves showing responses to sounds with different interaural time intervals. In the normal juvenile owl at 60 days, the response of the neuron resembles that of Figure 25.19: An interaural time difference (ITD) value of 0 ms corresponds to the center of the visual field. The tuning curves were shifted after rearing with prisms. Visual receptive fields were displaced to the left or the right by 23°. Now the best responses of the auditory neurons occurred at ITDs that corresponded to the displaced visual fields. The auditory and visual maps were again in register. (D) Time course of shift in auditory tuning curves in 3 immature owls. The adult owl (owl 222) showed no correction. (A kindly provided by E. Knudsen; B after Feldman and Knudsen, 1997; C and D after Brainard and Knudsen, 1998.)



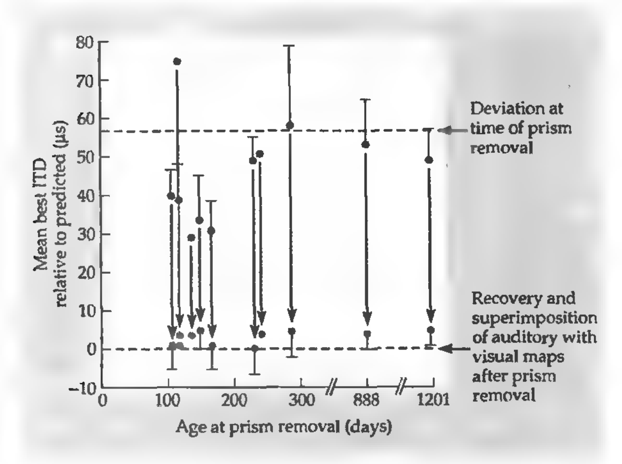


Рис. 25.21. Эффект обогащенного опыта в ранние периоды развития на формирование слуховой системы. (А) Результаты экспериментов с совятами, содержащимися в клетках, как показано на рис. 25.20. У двух совят зрительная и слуховая карта вновь пришли в соответствие (пунктирная линия), когда призмы убрали в возрасте 200 дней. Животное, у которого призмы были удалены в возрасте 219 дней (черная линия), не смогло адаптироваться к новым условиям. Карта зрительного поля вернулась к своему исходному расположению, в то время как слуховое пространство так и осталось смещенным на 23 градуса. Таким образом был определен критический период для коррекции слухового поля у сов после удаления призм. (В) Результаты экспериментов на совятах, имеющих обогащенный сенсорный опыт в раннем периоде жизни. У этих животных происходил обычный сдвиг слуховых карт и параметров ответов при помещении на их глаза призм в раннем возрасте. Восстановление после снятия призм не имело критического периода. После снятия призм происходило возвращение слуховых и зрительных карт в согласованное положение, даже если призмы снимали значительно позже 200 дней жизни.

Fig. 25.21. Effect of Enrichment in Early Life on the Auditory System. (A) Results of experiments on owls reared in cages, as in Figure 25.20. In two baby owls, the visual and auditory maps came into register again (dotted line) when prisms were removed before 200 days of age. The animal in which the prisms were removed at 219 days of age (black line) did not adjust to prism removal. The map of the visual field returned to its original position, while that of auditory space remained displaced by 23°. This showed that there was a critical period in these owls for correction after prism removal. (B) Results of experiments on owls with enriched experience in early life reared in an aviary. These animals showed the usual shift in auditory maps and response curves when reared with prisms in early life. The recovery after prism removal did not show a critical period. Removal of prisms was followed by superimposition of auditory with visual maps at times considerably later than 200 days. (After Brainard and Knudsen, 1998.)

те этого сова начала ориентировать свои глаза по направлению к источнику звука несмотря на искажающие призмы.

На более поздних этапах эксперимента призмы удаляли с глаз совы. Теперь вновь возникал дисбаланс между зрительной и слуховой картами. В том случае, если совы были моложе 200 дней в тот момент, когда удаляли призмы, слуховая карта во второй раз смещалась, возвращаясь к своему исходному положению, которое соответствует зрительной карте (рис. 25.20, также см. рис. 25.21A).

Результат обогащенного сенсорного опыта, приобретенного в ранний период жизни

Так как гибкость связей и особенности строения мозга в ранние периоды развития делают мозг чувствительным к сенсорной депривации, естественным будет вопрос: может ли произойти усиление работы коры, если в ранние периоды животное приобретает больше разнообразного опыта. Однако это довольно трудно проверить на практике: во-первых, но-

ворожденные животные должны находиться большую часть времени со своими матерями; во-вторых, трудно узнать наверняка, что будет разнообразным и приятным стимулом для, скажем, рожденного в природных условиях птенца, крысенка, мышонка или детеныша обезьяны.

Интересный и неожиданный результат был обнаружен Брайнардом и Кнудсеном[68] в опытах со смещением поля зрения амбарной совы, о чем мы писали выше. Во второй серии экспериментов они повторили проведенные ранее процедуры с одним существенным отличием, заключающемся в том, в каких условиях содержали совят. Совята проводили первые недели жизни в вольере, где они жили вместе с другими совами и могли летать. У этих совят с более богатым опытом, так же, как и до этого, обнаруживался эффект перемещения зрительного поля, согласно новому расположению зрительного поля. После того, как призмы удаляли, у молодых животных, которым не исполнилось 200 дней, как и прежде, слуховая пространственная карта возвращалась к своему исходному расположению в коре, чтобы вновь соответствовать зрительной карте. В чем же была новизна и отличие от предыдущих опытов? В том, что и через много времени после 200 дней, когда сова уже становится взрослой и зрелой, у таких сов происходило перемещение слухового поля при удалении призм, как будто критический период для них еще не закончился. Подобным же образом ранний критический период, в течение которого происходило перемещение слуховой карты в области четверохолмия при помещении на глаза совы призм, продлевался с 70 до 200 дней. Таким образом, богатый опыт продлял период адаптационной способности в слуховой системе. В других опытах было показано, что совы, которые научились однажды адаптироваться к призмам в раннем возрасте, могут устанавливать новые связи и во взрослом состоянии, в отличие от животных, которые не имели такого опыта[69].

Обогащение сенсорного опыта в ранние периоды жизни также может приводить к морфологическим изменениям в нейронах. В зрительной коре крыс и мышей, которые получали частые, ежедневные, чувствительные, но не вызывающие негативной реакции сенсорные стимулы в ранние периоды жизни, была обнаружена более выраженная ветвистость дендритов, чем у контрольных животных[70].

§ 6. Критические периоды для развития высших функций

Имеется большое количество литературных данных о том, что и другие поведенческие процессы у разных животных могут иметь критические периоды (period of susceptibility). Примером этого может быть импринтинг. Лоренц[71] показал, что утята следуют за любым движущимся объектом, при условии, если он демонстрировался им в течение первого дня после вылупления и служит «матерью» на протяжении всей их дальнейшей жизни. Подобно этому, мелодии, воспроизводимые птицами, такими как полосатый зяблик (zebra finch), зависят от песен, которые птенцы слышали в ранние периоды жизни, во время критического периода[72]. Птицы определенных видов могут запоминать и воспроизводить определенные (но не все) мелодии, которые они слышали в раннем возрасте.

У более высокоорганизованных животных — например собак — изучение поведения показывает, что если они живут вместе с людьми в течение критического периода с 4 до 8 недель после рождения, то они гораздо легче поддаются дрессировке и более послушны, чем животные, выросшие вне контакта с человеком[73]. Критическим периодом развития животных, по видимому, является время, в течение которого происходит значительное обострение чувств и способностей.

В чем же биологическое значение критических периодов?

Почему пластичность в раннем возрасте настолько выражена? Развивающийся мозг должен не только образовывать свои структуры, но также и уметь представлять окружающий мир, тело и его движения[74]. Глаз, например, должен вырасти до определенного размера для того, чтобы удаленные объекты находились строго в фокусе сетчатки, проецируясь через расслабленный хрусталик. Два глаза, находящиеся на расстоянии друг от друга, должны согласованно перемещаться у новорожденных. Кроме того, возникают большие изменения в размерах конечностей, диаметре головы и, следовательно, в нашем ощущении тела в первые месяцы и годы жизни.

Во всех этих случаях представление различных функций в мозгу должно быть согласовано, как это происходит в опытах Кнудсена с совой. Однако есть свидетельства того,

что пластичность возможна и во взрослом состоянии[75)–78)]. На функциональном уровне, даже во взрослом состоянии, мы можем быстро и обратимо адаптироваться к призмам, находящимся поверх наших глаз, которые вызывают смещение зрительных полей. Также могут заполняться «слепые пятна», являющиеся результатом повреждения глаза[79)]. У взрослых обезьян после повреждения и деафферентации возникают изменения в представлении тела в соматосенсорной коре.

Очень заманчиво порассуждать о возможном влиянии депривации на высшие функции человека. Как сказал Хьюбель[20)]:

> *Возможно, самой удивительной возможностью в будущем станет перенесение результатов подобного рода исследования на другие системы организма, помимо сенсорной. Психологи-экспериментаторы и психиатры подчеркивают важность раннего опыта для формирования определенного поведения — возможно, что лишение социальных контактов или наличие других аномальных эмоциональных ситуаций в раннем возрасте может приводить к нарушениям или искажениям в связях в каких-то еще неизвестных нам областях мозга?*

Обнаружить подобные физиологические механизмы для объяснения поведенческих феноменов является еще далекой, но не невозможной задачей.

Выводы

- Рецептивные поля и архитектура коры у новорожденных обезьян и котят во многом сходны с таковыми у взрослых.
- Однако при рождении в слое 4 зрительной коры области ветвления аксонов из ЛКТ перекрываются и клетки на протяжении первых 6 месяцев жизни получают управление от обоих глаз, вместо одного.
- В течение 3 первых месяцев жизни животное проходит критический период, во время которого закрытие век одного глаза вызывает значительные изменения в структуре и функции коры.
- Закрытие век одного глаза в критический период ведет к полной слепоте на этот глаз.
- При депривации глаз теряет управление над кортикальными клетками, что приводит к уменьшению размеров колонок глазного доминирования этого глаза.
- После критического периода закрытие век или удаление глаза не вызывают каких-либо изменений в коре.
- Бинокулярное закрытие век и искусственное косоглазие во время критического периода не приводят к изменениям в глазодоминантных колонках, однако ведут к потере бинокулярности зрения.
- Можно предположить, на основе приведенные данных, что между глазами существует конкуренция за управление клетками в зрительной коре.
- У новорожденных совят обработка слуховых сигналов может быть изменена при помощи изменения восприятия ими окружающего пространства в критический период.
- Обогащенный сенсорный опыт в раннем периоде развития увеличивает продолжительность критического периода.

Рекомендуемая литература

Обзоры

- Hubel, D. H. 1988. *Eye, Brain and Vision.* Scientific American Library, New York.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1977. Ferrier Lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc. R. Soc. Lond. B* 198: 1–59.
- Knudsen, E. I. 1999. Early experience and critical periods. In S. C. Landis, M. J. Zigmond, L. R. Squire, J. L. Roberts, and F. E. Bloom (eds.), *Fundamental Neuroscience.* Academic Press, New York, pp. 637–654.
- Singer, W. 1995. Development and plasticity of cortical processing architectures. *Science* 270: 758–764.
- Wiesel, T. N. 1982. The postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature* 299: 583–591.
- Wong, R. O. 1999. Retinal waves and visual system development. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 29–47.

Статьи

- Antonini, A., Gillespie, D. C., Crair, M. C., and Stryker, M. P. 1998. Morphology of single geniculocortical afferents and functional recovery of the visual cortex after reverse monocular deprivation in the kitten. *J. Neurosci.* 18: 9896–9909.
- Brainard, M. S., and Knudsen, E. I. 1998. Sensitive periods for visual calibration of the auditory space map in the barn owl optic tectum. *J. Neurosci.* 18: 3929–3942.
- Carlson, M., Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1986. Effects of monocular exposure to oriented lines on monkey striate cortex. *Brain Res.* 390: 71–81.

- Horton, J. C., and Hocking, D. R. 1996. An adult-like pattern of ocular dominance columns in striate cortex of newborn monkeys prior to visual experience. *J. Neurosci.* 16: 1791–1807.
- Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1965. Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J. Neurophysiol.* 28: 1041–1059.
- Hubel, D. H., Wiesel, T. N., and LeVay, S. 1977. Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 278: 377–409.
- Knudsen, E. I., and Knudsen, P. F. 1990. Sensitive and critical periods for visual calibration of sound localization by barn owls. *J. Neurosci.* 10: 222–232.
- LeVay, S., Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. 1980. The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. *J. Comp. Neurol.* 191: 1–51.
- Meissirel, C., Wikler, K. C., Chalupa, L. M., and Rakic, P. 1997. Early divergence of magnocellular and parvocellular functional subsystems in the embryonic primate visual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5900–5905.
- Meister, M., Wong, R. O., Baylor, D. A., and Shatz, C. J. 1991. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science* 252: 939–943.
- Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. 1963. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J. Neurophysiol.* 26: 1003–1017.

Цитированная литература

1. Riesen, A. H., and Aarons, L. 1959. *J. Comp. Physioi Psychol.* 52: 142–149.
2. Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. 1974. *J. Comp. Neuroi* 158: 307–318.
3. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1963. *J. Neuraphysiol.* 26: 994–1002.
4. Crair, M. C., Gillespie, D. C., and Stryker, M. P. 1998. *Science* 279: 566–570.
5. Chapman, B., Stryker, M. P., and Bonhoeffer, T. 1996. *J. Neurosci.* 16: 443–6453.
6. Wiesel, T. N. 1982. *Nature* 299: 583–591.
7. LeVay, S., Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. 1980. *J. Comp. Neurol.* 191: 1–51.
8. LeVay, S., Stryker, M. P., and Shatz, C. J. 1978. *J Comp. Neurol.* 179: 223–244.
9. Horton, J. C. and Hocking, D. R. 1996. *J. Neurosci.* 16: 1791–1807.
10. Rakic, P. 1977. *Philos. Irons. R. Soc. Lond. B* 278: 245–260.
11. Shatz, C. J. 1996. *Proc. Nati Acad. Sci. USA* 93: 602–608.
12. Rakic, P. 1986. *Trends Neurosci.* 9: 11–15.
13. Kuljis, R. O., and Rakic, P. 1990. *Proc. Natl. Acod. Sci. USA* 87: 5303–5306.
14. Bernstein, M., and Lichtman, J. W. 1999. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 364–370.
15. Caviness, V. S., jr. 1982. *Dev. Brain Res.* 4: 293–302.
16. Rakic, P., and Caviness, V. S., jr. 1995. *Neuron* 14: 1101–1104.
17. Guillery, R. W. 1974. *Sci. Am.* 230(5): 44–54.
18. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1971. *J. Physiol.* 218: 33–62.
19. Kliot, M., and Shatz, C. j. 1985. *J. Neurosci.* 5: 2641–2653.
20. Hubel, D. H. 1988. *Eye, Brain and Vision.* Scientific American Library, New York.
21. Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. 1963. *J. Neurophysiol.* 26: 1003–1017.
22. Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. 1963. *J. Neurophysiol.* 26: 978–993.
23. Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. 1965. *J. Neurophysiol.* 28: 1029–1040.
24. Guillery, R. W., and Stelzner, D. J. 1970. *J. Comp. Neurol.* 139: 413–422.
25. Humphrey, A. L. et al. 1985. *J. Comp. Neurol.* 233: 159–189.
26. Hubel, D. H., Wiesel, T. N., and LeVay, S. 1977. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 278: 377–409.
27. Horton, J. C. and Hocking, D. R. 1997. *J. Neurosci.* 17: 3684–3709.
28. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1970. *J. Physiol.* 206: 419–436.
29. Malach, R., Ebert, R., and Van Sluyters, R. C. 1984. *J. Neurophysiol.* 51: 538–551.
30. Cynader, M., and Mitchell, D. E. 1980. *J. Neurophysiol.* 43: 1026–1040.
31. Daw, N. W., et al. 1995. *Ciba Found. Symp.* 193: 258–276.
32. Blakemore, C., and Van Sluyters, R. C. 1974. *J. Physiol.* 237: 195–216.
33. Kim, D. S., and Bonhoeffer, T. 1994. *Nature* 370: 370–372.
34. Antonini, A., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 9896–9909.
35. Antonini, A., andStryker, M. P. 1998. Vis. Neurosci. 15: 401–409.
36. Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1965. *J. Neurophysiol.* 28: 1041–1059.
37. Lowel, S., and Singer, W. 1992. *Science* 255: 209–212.
38. Baker, F. H., Grigg, P., and van Noorden, G. K. 1974. *Brain Res.* 66: 185–208.
39. Carlson, M., Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. 1986. *Broin Res.* 390: 71–81.
40. Sengpiel, F., Stawinski, P., and Bonhoeffer, T. 1999. *Nature Neurosd.* 2: 727–732.
41. Francois, J. 1979. *Ophthalmology* 86: 1586–1598.

42. Birch, E. E., et al. 1993. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 3687–3699.
43. Hamill, M. B., and Koch, D. D. 1999. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 10: 4–9.
44. Daw, N. W. 1998. *Arch. Ophthalmol.* 116: 502–505.
45. Van Noorden, G. K. 1990. *Binocular Vision and Ocular Motility.* Mosby, St. Louis, MO.
46. Horton, J. C., and Hocking, D. R. 1998. *Vis. Neurosci.* 15: 289–303.
47. Horton, J. C., and Hocking, D. R. 1996. *Vis. Neurosci.* 13: 787–795.
48. Stone, R. A., et al. 1988. *Proc.* Natl. *Acad. Sci. USA* 85: 257–260.
49. Stryker, M. P., and Harris, W. A. 1986. *J. Neurosci.* 6: 2117–2133.
50. Sretavan, D. W., Shatz, C. J., and Stryker, M. P. 1988. *Nature* 336: 468–471.
51. Reiter, H. O., Waitzman, D. M., and Stryker, M. P. 1986. *Exp. Brain Res.* 65: 182–188.
52. Hata, Y., Tsumoto, T., and Stryker, M. P. 1999. *Neuron* 22: 375–381.
53. Maffei, L, and Galli-Resta, L 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2861–2964.
54. Meister, M., et al. 1991. *Science* 252: 939–943
55. Wong, R. O. 1999. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 29–47.
56. Zhou, Z. J. 1998. *J. Neurosci.* 18: 4155–4165.
57. Brivanlou, I. H., Warland, D. K., and Meister, M. 1998. *Neuron* 20: 527–539.
58. Larkum, M. E., Zhu, J. J., and Sakmann, B. 1999. *Nature* 398: 338–341.
59. Berardi, N., and Maffei, L 1999. *J. Neurobiol.* 41: 119–126.
60. Pizzorusso, T., et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2572–2576.
61. Capsoni, S., et al. 1999. *Neuroscience* 88: 393–403.
62. Meissirel, C., et al. 1997. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 5900–5905.
63. Godecke, I., and Bonhoeffer, T. 1996. *Nature* 379: 251–254.
64. Knudsen, E. I. 1999. *J. Comp. Physiol.* [*A*] 185: 305–321.
65. Gold, J. I., and Knudsen, E. J. 1999. *J. Neurophysiol.* 82: 2197–2209.
66. Knudsen, E. I., and Knudsen, P. F. 1990. *J. Neurosci.* 10: 222–232.
67. Feldman, D. E., and Knudsen, E. I. 1997. *J. Neurosci.* 17: 6820–6837.
68. Brainard, M. S., and Knudsen, E. I. 1998. *J. Neurosci.* 18: 3929–3942.
69. Knudsen, E. J. 1998. *Science* 279: 1531–1533.
70. Venable, N., et al. 1989. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 49: 140–144.
71. Lorenz, K. 1970. *Studies in Animal and Human Behavior*, Vols. 1 and 2. Harvard University Press, Cambridge, MA.
72. Arnold, A. P., and Schlinger, B. A. 1993. *Brain Behav. Evol.* 42: 231–241.
73. Fuller, J. L. 1967. *Science* 158: 1645–1652.
74. Singer, W. 1995. *Science* 270: 758–764.
75. Rolley, D. B., Chen-Bee, C. H., and Frostig, R. D. 1999. *Neuron* 24: 623–637.
76. Buonomano, D. V., and Merzenich, M. M. 1998. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 149–186.
77. Welker, E., et al. 1992. *J. Neurosci.* 12: 153–170.
78. Sterr, A., et al. 1998. *J. Neurosci.* 18: 4417–4423.
79. Gilbert, C. D. 1998. *Physiol. Rev.* 78: 467–485.

Раздел V

ВЫВОДЫ

Глава 26

Нерешенные вопросы

С каждым новым изданием книги «От нейрона к мозгу» наше понимание того, как клетки проводят электрические сигналы, как они взаимодействуют друг с другом, а также как устанавливаются нервные связи в процессе роста, значительно углубляется. Особенно существенный прогресс в нейронауках за последние несколько лет был достигнут благодаря новым методам молекулярной биологии и развитию техники отображений процессов, происходящих в живых тканях. Невозможно, однако, предугадать, какие методы станут доступными в будущем и какие новые вопросы они повлекут за собой. Так, к моменту первого издания этой книги в 1976 году мало кто мог представить себе использование точечных мутаций для изучения воротных токов или оптической регистрации функционирующих колонок в целом живом мозге. Многие проблемы, которые сейчас кажутся неразрешимыми, потребуют для своего решения технических приемов, пока еще даже трудно вообразимых.

Что можно сказать сегодня о новых направлениях и концепциях, которые могут быть включены в следующее издание этой книги? Разумным представляется предположить, что более интенсивным будет взаимодействие между нейрофизиологами, работающими на клеточном и молекулярном уровнях, специалистами в когнитивных нейронауках и неврологами, что, несомненно, важно для понимания таких интегративных высших функций мозга, как восприятие, движение и память. Можно также надеяться, что увеличение фундаментальных знаний о нервной системе приведет к предотвращению и облегчению течения заболеваний нервной системы, которые возникают по неясным пока еще причинам и для которых не разработана эффективная терапия.

Открытые вопросы, касающиеся нервной системы и мозга, весьма отличаются от вопросов, относящихся к таким предметам, как физика, химия и даже биология в целом. И указать на важные пробелы в нашем знании и понимании работы мозга может не только читатель нашей книги. Даже дилетант, не имеющий отношения к науке, осознает, что мы не понимаем механизмы осуществления высших функций мозга, таких как сознание, обучение, сон, координирование движений, или, даже, ка́ким образом мы сознательно сгибаем палец. Но этому человеку гораздо труднее указать, чего мы еще не знаем о теории относительности, физике элементарных частиц, химических реакциях или генетике. Именно изобилие достаточно очевидных и явно важных вопросов делает нейронауку такой привлекательной в наши дни.

Чтобы привести пример из повседневной жизни об ограниченности наших знаний о том, как функционирует мозг, рассмотрим такой вид спорта, как теннис. Опытный игрок, например Мартина Хингис, видит, как

ее противник наносит удар по мячу. Она способна быстро вычислить, куда он приземлится и как высоко отскочит. Мяч будет двигаться со скоростью 100 км/ч, но она может броситься к нужному месту, вытянуть руку так, чтобы мяч попал точно в центр ракетки, и с необходимой силой послать его прямо к задней линии корта противника (используя известную слабость оппонента в ударах слева). С тем же успехом можно привести примеры того, как пеликан ныряет за рыбой, как лягушка ловит муху кончиком языка, или как пчела берет нектар с определенного цветка. В каждом из этих примеров необходимо выделить предметы из их пестрого окружения, разработать, начать, отрегулировать и привести к завершению ряд высоко координированных движений. И, каким-то образом, для всего этого должны существовать необходимые нейронные связи.

В последующих параграфах рассматриваются избранные нерешенные проблемы нейронауки, затронутые в книге ранее, которые могут быть решены в будущем.

Клеточные и молекулярные исследования нейрональных функций

Вначале стоит отметить, что за последние несколько лет новая информация о каналах, рецепторах, трансмиттерах, транспортерах, вторичных посредниках и долговременных изменениях в синапсах стала поступать с такой скоростью, что открытые вопросы, поставленные сегодня, возможно, уже найдут свои решения ко времени выхода этой книги.

Итак, все еще остаются необъясненными тонкие структурные изменения белков, опосредующие процессы открытия, закрытия и инактивации ионных каналов. Неясно, каково функциональное предназначение столь большого числа подтипов ионных каналов, рецепторов и транспортеров. Другая большая проблема — это механизм доставки этих молекул к строго определенным участкам нейрона, например, натриевых каналов к перехватам Ранвье, рецепторов возбуждающих аминокислот к шипикам дендритов, а синаптических везикул — к активным зонам пресинаптических терминалей. Формирование постсинаптических специализаций нервно-мышечного синапса дает пример идентификации ряда ключевых молекул в подобных процессах (см. главу 24), однако детальные механизмы и в этом случае остаются во многом не установленными.

Чтобы объяснить механизмы, лежащие в основе таких проблем, как долговременная потенциация и долговременная депрессия, было проведено огромное число детальных экспериментов. К числу фундаментальных вопросов, связанных с этим феноменом, относится роль ретроградных сигналов от постсинаптического нейрона к пресинаптическим терминалям. Другой важный вопрос — являются ли долговременная потенциация и депрессия действительно необходимыми для формирования памяти и извлечения информации из мест хранения.

Функциональное значение межклеточного перемещения веществ

Многочисленными экспериментами было продемонстрировано транс-синаптическое перемещение аминокислот или белков между нейронами, например, от сетчатки через латеральное коленчатое ядро к зрительным центрам коры головного мозга. То, что это перемещение происходит, точно установлено. Тем не менее, мы не обладаем важной информацией о механизмах этого переноса и его функциональном значении. Межклеточное перемещение малых молекул происходит между клетками, связанными щелевыми контактами (см. также главу 7). Предполагается, что межклеточное перемещение веществ представляет собой механизм контроля роста и развития клеток. Связанный с этим вопрос касается роли глиальных клеток для функционирования нейронов (глава 8). В особенности неясной является количественная характеристика обмена молекул между глиальными клетками и нейронами, значение такого обмена для функционирования нейронных сетей.

Развитие и регенерация

Несмотря на значительный прогресс, все еще неизвестно, как нейроны выбирают свои специфические мишени. Уже в настоящее время разрабатываются подходы к рассмотрению таких вопросов, как направленный рост отростков нейронов к мишеням, прекращение роста и развитие связей посредством избирательного удаления отростков или смерти клеток. В то же время мы находимся только у самого порога знания о том, как с такой невероятной точностью осуществляются нервные связи. Как, например, устанавливаются связи терминалей афферентных волокон мышечных веретен на мотонейронах спинного

мозга? Как среди нескольких тысяч нейронов, приходящихся на каждый кубический миллиметр нервной ткани, выбирается и иннервируется нужный участок соответствующего мотонейрона? Каким образом одна и та же сенсорная клетка на разных синапсах мозгового вещества образует синапсы с разными характеристиками выделения трансмиттера?

Что же касается регенерации в ЦНС млекопитающих после повреждения, причины несостоятельности регенерации также неизвестны, несмотря на значительный успех в понимании молекулярных механизмов, способствующих или замедляющих рост отростков нейронов.

Другой важный вопрос касается роли практики для развития организма на ранних стадиях жизни. В частности, мы почти ничего не знаем о роли критических периодов в созревании высших функций, включая эмоциональные характеристики и личность.

Генетические подходы оценки функций нервной системы

Трудно даже предсказать, каковы будут последствия революции в методах генетики для понимания работы мозга. Уже используемые в настоящее время трансгенные животные, у которых были изменены или удалены определенные гены, являются мощным инструментом познания функций мозга. Однако в связи с избыточностью функций и непредвиденными побочными эффектами остается еще много трудностей в интерпретации результатов, полученных у этих животных. Завершение проекта «Геном человека» позволяет идентифицировать гены и молекулы, которые изменяются в ходе болезней. Проанализировать такую огромную массу информации и отделить важное от второстепенного является поистине необъятной задачей. Масштаб проблемы иллюстрирует наследственное заболевание — болезнь Хантингтона, при которой измененный ген можно распознать, анализируя генетический материал родственников[1]. Однако, несмотря на то, что измененные последовательности генов при болезни Хантингтона уже давно установлены, остается неизвестной функция связанных с ним белков. Аналогично, мутации некоторых генов, кодирующих потенциал-активируемые кальциевые каналы, приводят к наследственным гемиплегическим мигреням и мозжечковой атаксии[2]. Но и в этом случае не существует ясной связи, какой механизм связывает эти явления. Разработка терапии на уровне воздействия на генетический аппарат остается наиболее многообещающей перспективой для подобных состояний. Возможно, путь к разработке такого лечения станет проще после развития способов доставки реагентов к месту действия, а также после разработки методов временного и пространственного контроля процессов экспрессии белков.

Сенсорная и моторная интеграция

В вопросах, которые касаются невообразимого числа нейронов и их отростков с неясными функциями (в частности немиелинизированных волокон, которые численно значительно превосходят миелинизированные волокна), наши знания имеют серьезный пробел. Более конкретным примером является большое разнообразие амакриновых клеток (более 20), способствующих обработке информации в сетчатке. Другой пример — роль афферентов II-й группы от мышечных веретен в функционировании спинного мозга.

Механизмы инициации и контроля координированных движений все еще остаются открытыми, хотя в их разрешении заметен прогресс. Сегодня есть надежда, что благодаря неинвазивным методам получения изображений мозга в сочетании со стимуляцией можно решить ряд вопросов, детально регистрируя мозговую активность. Например, еще более 50 лет назад Эдриан обнаружил, что, научившись писать свое имя, можно сделать это не только пальцами рук, но и держа карандаш пальцами ног[3]. Однако до сих пор неизвестно, как объясняется наша способность к переносу таких двигательных программ от одной исполнительной системы к другой.

Подобным образом, при рассмотрении сенсорных систем, нейрональные механизмы процессов интеграции в единое целое одного образа, например, собаки (не говоря уже о более сложных картинах окружающего мира), остаются пока вне нашего понимания. При обсуждении вопросов такого типа представляется всемогущий гомункулус — клетка, или маленький человечек в нашем мозге, который фактически видит то, что видим мы. Хотя все высмеивают эту идею, гомункулус все же имеет полезное назначение: он постоянно напоминает нам о недостаточности наших знаний о высших функциях мозговой коры. Как только ответы будут найдены, он умрет естественной смертью, как флогистон. Однако пока мы не можем заменить его компьютером.

Вдобавок к этим явным пробелам в наших знаниях остаются «черными ящиками» механизмы точного контроля температуры тела, кровяного давления, функций кишечника. Взаимодействие мозга с иммунной системой представляет еще одну обширную область активных исследований, все еще находящихся на ранней стадии с большим количеством открытых вопросов.

Математическое моделирование и вычислительные нейронауки всецело зависят от данных, получаемых в экспериментах по регистрации активности ионных каналов, конкретных нейронов, синапсов и нейронных сетей. Однако до сих пор ни в одной другой области не был достигнут успех, сравнимый со значением уравнения Ходжкина—Хаксли для описания изменений ионной проницаемости во время генерации потенциала действия. Одной из главных причин этого является недостаток экспериментальных данных, необходимых для воспроизведения столь сложных процессов, как синаптическая пластичность и нейрональная интеграция. Например, как можно было надеяться построить модель пластичности нейронных сетей коры до открытия рецепторов NMDA или магниевого блока проводимости каналов, и сколько подобных механизмов еще ждут своего открытия?

Ритмичность

Нейрональные ритмы, обсуждавшиеся в этой книге, включают дыхательные и циркадианные ритмы, так же как и периодическую нейронную активность в мозжечке, гиппокампе, таламусе и спинном мозге. За исключением нескольких примеров, таких как функционирование стоматогастрического ганглия омара и плавание пиявки, мы не обладаем достаточной информацией о механизмах происхождения или ритмичности залповой активности. Более того, неясно, какие функции выполняют колебания тока в таких известных явлениях, как альфа- и дельта-волны в электроэнцефалограмме.

Вклад клинической неврологии в изучение мозга

В течение многих лет неврология была не только неотделима от нейробиологии, но и предоставляла собой единственный метод для изучения высших функций мозга. Успехом ранней неврологии было использование естественных событий, таких как травмы нервной системы, для описания функций различных областей мозга путем корреляции клинических симптомов с локализацией повреждения. Эти достижения тем более поразительны, если учесть, что использование повреждений для определения функции имеет много «подводных камней». При наличии в настоящее время более современных методов, таких как магнитно-резонансный или эмиссионно-позитронный томограф, неврологи в состоянии локализовать и наблюдать за повреждениями непосредственно, следить за ходом заживления и делать выводы о высших функциях коры[4]. Есть все основания полагать, что существенное повышение пространственного и временного разрешения не за горами. Это могло бы позволить наблюдать в реальном времени за последовательностью нейронных событий, приводящих к возникновению решений, восприятия или формированию памяти.

Драматическая история Финеаса Гейджа демонстрирует то, как повреждение мозга может быть использовано для анализа его функций[5]. В 1848 году в возрасте 25 лет Финеас Гейдж, работая бригадиром на железной дороге в Вермонте, пострадал от массивного мозгового повреждения. Когда он забивал железный прут для того, чтобы установить пороховой заряд в каменной породе, порох взорвался и вогнал ему железный прут прямо в череп. Гейдж потерял сознание лишь на короткое время и вскоре смог подняться и заговорить. Доктора поразило то, что больной быстро поправился и был в состоянии вести относительно нормальную жизнь в течение более 12 лет. Личность Гейджа, однако, подверглась большим изменениям. Из спокойного, трезвого, работящего, аккуратного рабочего он превратился в громкоголосого, болтливого, нетерпеливого и беспокойного хвастуна. Таким образом, в то время, когда еще ничего не было известно о сенсорной, моторной, зрительной и слуховой коре, неврологическое обследование показало, что высшие функции человеческого поведения и характеристики личности связаны с префронтальной областью коры больших полушарий. Но случай Гейджа был достаточно уникальным в том смысле, что место повреждения фронтальной коры и его обширность легко определялись у живого пациента.

Другие примеры неврологических наблюдений девятнадцатого столетия, послужившие определению специфических областей мозга,




Рис. 26.1. Рисунок кошки, сделанный пациентом, имеющим значительное повреждение правой париетальной доли. Типичным для этого поражения является синдром «игнорирования», когда не замечаются детали, находящиеся с левой стороны.

Fig. 26.1. Drawing of a Cat made by a patient who had a large lesion of the right parietal lobe. As commonly seen in neglect, all the details on the left were overlooked. (Drawing kindly provided by J. Driver; after Driver and Halligan, 1991.)

вовлеченных в высшие функции, принадлежат Брока и Вернике. Эти ученые сопоставляли речевые дефекты с областями коры, поврежденными патологическими нарушениями, такими как инсульт или опухоли. Даже тогда, когда точные области повреждения неизвестны, клиницисты и нейрофизиологи могут достоверно вести диагностику на основе анализа таких процессов, как долговременная и кратковременная память.

Очень необычными являются эффекты одностороннего повреждения париетальной доли больших полушарий головного мозга справа. Пациенты с такими повреждениями перестают осознавать, что существуют две стороны тела и две стороны во внешнем мире. Левая сторона тела как бы перестает существовать, поэтому пациент не воспринимает левую руку как свою собственную. Если подобных пациентов попросить нарисовать ромашку, все лепестки будут только справа, так же как и все спицы велосипедного колеса[6)]. Рисунок кошки, выполненный праворуким пациентом 61 года с париетальным повреждением, показан на рис. 26.1. Важно подчеркнуть, что это настоящие неврологические дефекты, а не истерические реакции пациента. Подобные клинические наблюдения показывают, что наш внутренний мир, который кажется таким полным, таким единым и таким совершенным, состоит из более простых компонентов, соединенных вместе в один континуум.

Помимо результатов сканирования мозга и постоянно совершенствуемых методик исследования языка и характера, дальнейший прогресс в изучении высших функций может во многом определяться когнитивными нейронауками и неврологией.

Вклад фундаментальной нейронауки в неврологию

Между фундаментальными и прикладными нейронауками явно имеется связь с двусторонним движением. Методы молекулярной биологии и генетические методы уже начинают играть свою роль в диагностике таких заболеваний, как ретинобластома и болезнь Хантингтона. Рассматривается возможность лечения генетически реконструированными клетками мышечной дистрофии и болезни Паркинсона. Нейрохирургами используются сложные электрофизиологические методы для регистрации активности отдельных нейронов, для имплантации стимулирующих электродов (например, для контроля работы мочевого пузыря), для методов неинвазивной стимуляции, а также разработки протезов для замещения утраченных функций.

Один из примеров иллюстрирует, как исследование в фундаментальной нейронауке может помочь обеспечить новый подход в лечении серьезных заболеваний. Так, в результате работ Хьюбеля и Визеля по потере чувствительности у новорожденных котят и обезьян стало ясно, что новорожденного ребенка с врожденной катарактой нужно оперировать как можно раньше. Такие процедуры предотвратили несчетное число случаев слепоты. Причем это не было результатом, исходно запланированным исследователями в начале экспериментов на рецептивных полях зрительного анализатора.

Причины большинства заболеваний нервной системы, от которых страдает человечество (например, болезнь Альцгеймера, или амиотрофический латеральный склероз), практически неизвестны. Отсутствует и эф-

фективное лечение. В этой ситуации можно было бы предложить передать деньги, используемые для фундаментальной нейронауки, в прикладную науку или неврологию. Конечно, было бы лучше найти непосредственно средство излечения от заболеваний, чем пытаться выяснить, как функционирует нервная система. Однако в случаях, когда прикладные исследования преобладали над фундаментальными биологическими разработками, результаты, мягко говоря, разочаровывали. Например, Советский Союз основал и поддерживал крупные институты прикладных исследований в физиологии и фармакологии, каждый из которых насчитывал сотни научных работников, в которых изучение проблемы ради ее интереса и красоты считалось «буржуазным». Однако в период существования Советского Союза не было разработано ни одного лекарственного препарата, который вошел бы в рутинную клиническую практику.

Степень прогресса

Хотя книги о мозге и сознании появляются с невообразимой скоростью, было бы, несомненно, плохой услугой для нейронауки делать вид, что ответы на чрезвычайно сложные вопросы этой области человеческого знания находятся совсем рядом. Например, было опрометчиво в 1996 году, рассматривая нейронные сети, вовлеченные в контроль игры в теннис, предсказывать в передовице "Science", что «основные принципы нейронального развития будут открыты к концу этого века»[7]. Существует естественная тенденция ученых и журналистов быть оптимистичными и обнадеживать, что решения трудных проблем близки. Так, предположительное время для лечения повреждений спинного мозга было обозначено примерно 7–10 лет (более семи лет назад!). Хотя подобные высказывания могут поощрять интерес ученых к этой области, они же могут иметь разрушительное действие на пациентов, если они не выполняются за обещанное время, как это, к несчастью, часто происходит[8].

Заключение

Когда сталкиваешься с фантастическим разнообразием поведения живых существ — от ползущего муравья до студента, читающего книгу, — становится ясно, что понимание того, как функционирует нервная система, является захватывающим, бесконечным занятием первостепенной важности.

История нейронауки учит, что новые подходы к лечению заболеваний зачастую возникают неожиданно из экспериментов, посвященных порой совершенно другим вопросам. Более того, общее накопление естественнонаучных знаний также является объективной необходимостью, без него даже логичные подходы к предупреждению и лечению неврологических заболеваний могут дать лишь частичный эффект. В этой ситуации почти невозможно определить истинную значимость конкретного проекта в то время, когда он находится только в процессе выполнения. Поэтому на вопрос о «значимости» исследовательской работы абсолютно честным был бы очень простой ответ: «Не знаю!»

Несмотря на успехи в лечении болезней, многие аспекты значения для человеческого общества знаний о механизмах функционирования нервной системы находятся сегодня просто вне нашего сегодняшнего воображения.

Рекомендуемая литература

- Adams, R. D., Victor, M., and Ropper, A. H. 1997. *Principles of Neurology*, 6th Ed. McGraw-Hill, New York.
- Burgess, P. W., and Shallice, T. 1996. Bizarre responses, rule detection and frontal lobe lesions. *Cortex* 32: 241–259.
- Crick, F. 1999. The impact of molecular biology on neuroscience. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 2021–2025.
- Goldman-Rakic, P. S. 1999. The physiological approach: Functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 46: 650–661.
- Jeannerod, M., and Frak, V. 1999. Mental imaging of motor activity in humans. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 735–739.
- Mountcastle, V. 1998. Brain science at the century's ebb. *Daedalus* 127: 1–36.
- Zeki, S. 1999. Splendours and miseries of the brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354: 2053–2065.

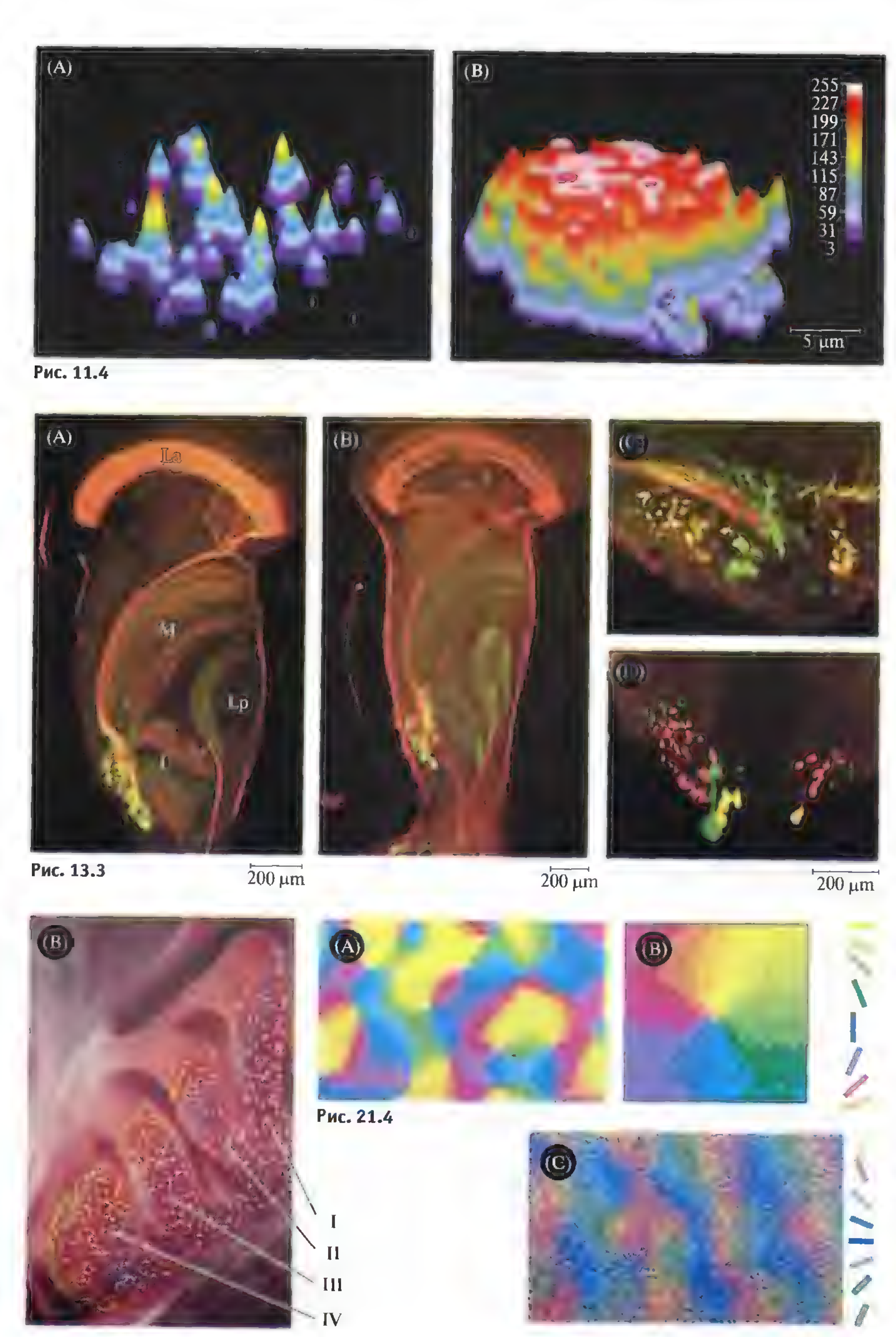


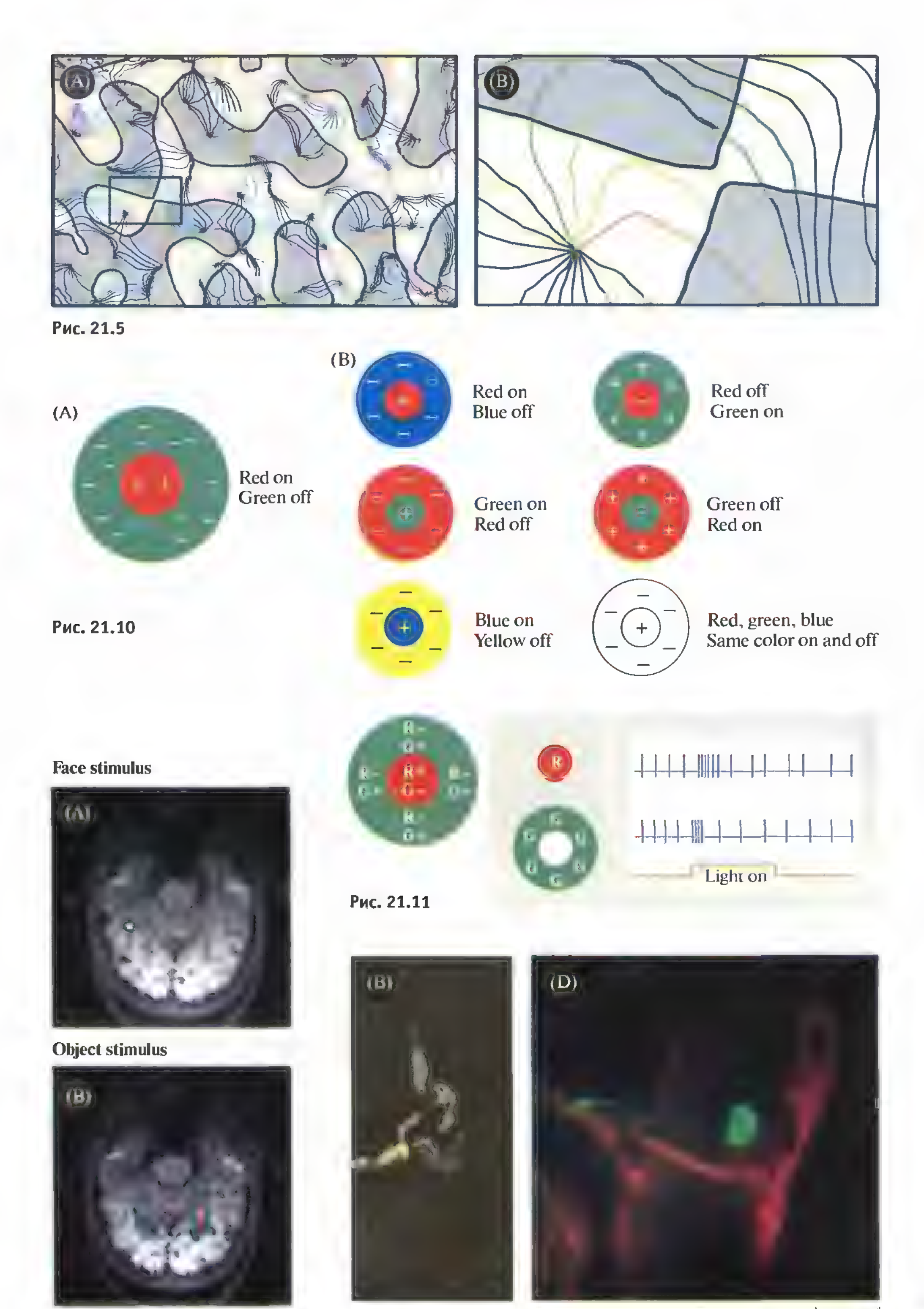
Рис. 11.4

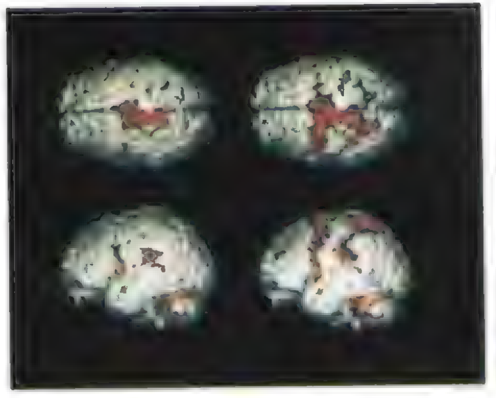
Рис. 13.3

Рис. 17.15

Рис. 21.4

Рис. 25.1


(A)
(B)
Рис. 21.5
(A)
Red on
Green off
(B)
Red on
Blue off
Red off
Green on
Green on
Red off
Green off
Red on
Blue on
Yellow off
Red, green, blue
Same color on and off
Рис. 21.10
Light on
Рис. 21.11
Face stimulus
(A)
Object stimulus
(B)
Рис. 21.15
(B)
(D)
20 μm
Рис. 23.36



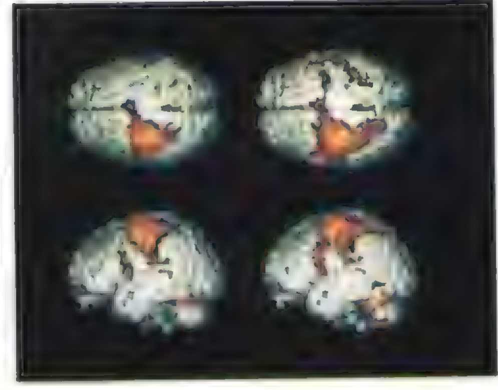




Рис. 22.19

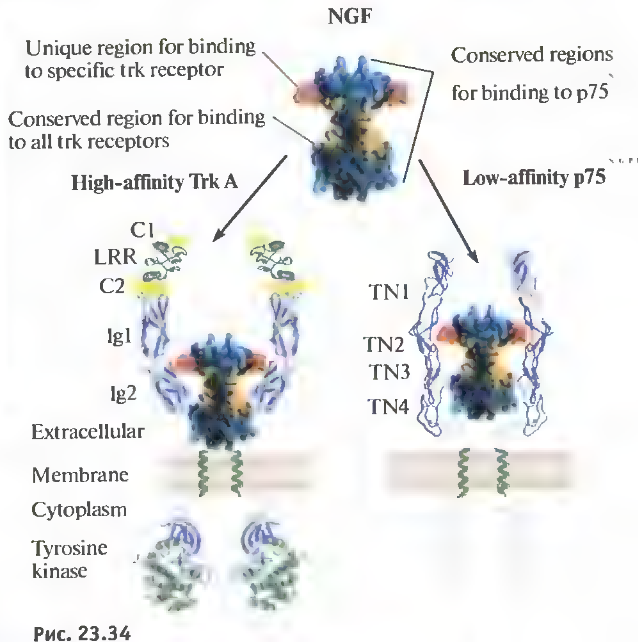


Рис. 23.34

(B) Normal



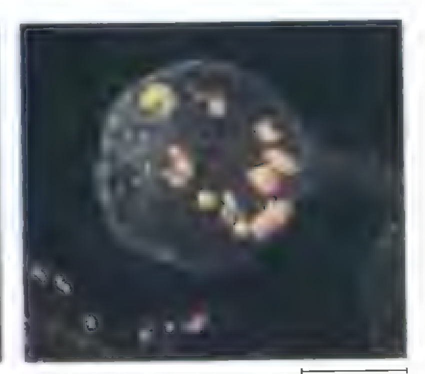


Рис. 24.8

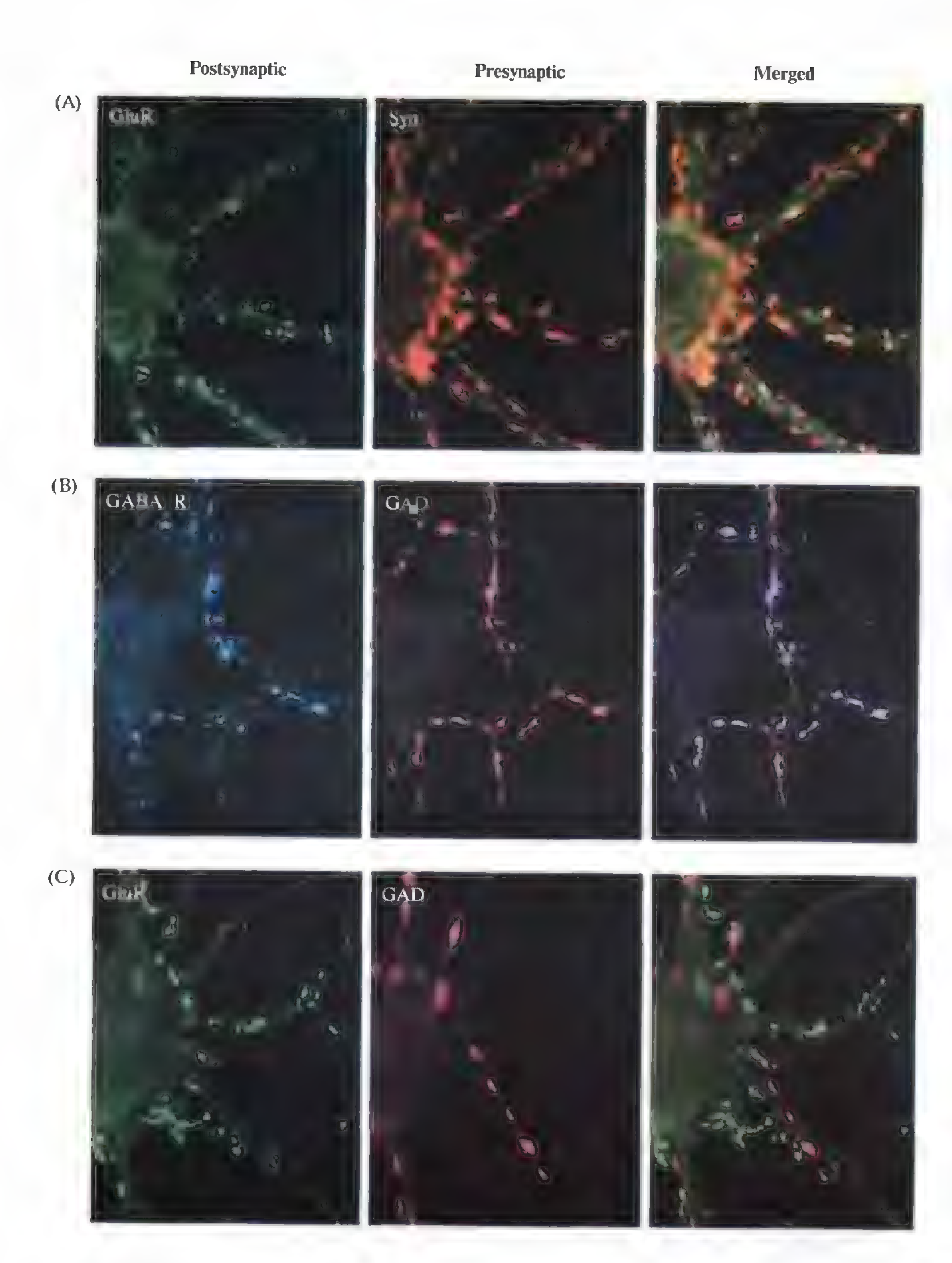


Рис. 23.32

Цитированная литература

1. Haque, N. S., Borghesani, P., and Isacson, O. 1997. *Mol. Med. Today* 3: 175–183.
2. Burgess, D. L., and Noebels, J. L. 1999. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868: 199–212.
3. Adrian, E. D. 1946. *The Physical Background of Perception*. Clarendon, Oxford, England.
4. Adams, R. D., Victor, M., and Ropper, A. H. 1997. *Principles of Neurology*, 6th Ed. McGraw-Hill, New York.
5. Harlow, J. M. 1868. *Publ. Mass. Med. Soc.* 2: 328–334.
6. Driver, J., and Halligan, P. W. 1991. *Cogn. Neuropsychol.* 8: 475–496.
7. Raff, M. 1996. *Science* 274: 1063.
8. Krauthammer, C. 2000. *Time Magazine February* 14: 76.

Приложение А

Электрический ток в цепи

Для понимания электрических цепей, описанных в этой книге, необходимо усвоить некоторые основные понятия физики. Для наших целей достаточно описать свойства элементов электрической цепи, чтобы понять, как аналогичные им модели работают в нервных волокнах. Трудности, встречающиеся при первом прочтении статей по электрическим цепям, часто происходят из-за того, что используемые параметры имеют абстрактный характер. Многие из пионеров электрофизиологии сталкивались с проблемой терминологии, разработанной в прошлом веке для описания движения жидкостей. Поэтому такие термины, как поток, течение, потенциал, сопротивление, емкость в равной степени применяются как в электричестве, так и в гидравлике. Демонстрацией аналогии между двумя системами является то, что сложные задачи по гидравлике могут быть решены как эквивалентные электрические цепи.

Аналогия между простой электрической цепью и ее гидравлическим эквивалентом проиллюстрирована на рис. 1. Первое необходимое условие работы системы заключается в том, что для поддержания потока необходим источник энергии. В гидравлической цепи этим источником является насос, в электрической цепи — батарея. Второе условие состоит в том, что ни вода, ни электрический заряд не создаются и не теряются внутри подобной системы. Следовательно, скорость течения воды в гидравлической цепи одинакова в точках **a**, **b** и **c**, так как вода между ними не прибавляется и не убывает. Электрический ток в аналогичной цепи также одинаков в трех соответствующих точках. В обеих цепях существуют несколько сопротивлений потоку. В гидравлической цепи сопротивлениями являются узкие трубы, в электрической цепи более узкие провода представляют большее сопротивление потоку электричества (сужение проводов повышает сопротивление протекающему току).

Термины и единицы измерения при описании электрического тока

Единица измерения, используемая для выражения скорости потока жидкостн, в определенной степени дело вкуса; можно измерять поток воды через трубу, например, в кубических футах в минуту, хотя в некоторых случаях миллнметры в час подходят больше. Сила электрического тока обычно измеряется в **кулонах в секунду** или в **амперах** (сокращенно А). Однн кулон соответствует заряду, содержащемуся в $6{,}24 \cdot 10^{18}$ электронах. В электрических цепях и уравнениях ток обычно обозначается I или i. Как н поток воды, ток векторная величина, иначе говоря, он имеет определенное направление. Направление тока часто обозначают стрелками, как на графике 1, всегда предполагая, что ток движется от положительного к отрицательному полюсу батареи.

Что означают термины положительный или отрицательный применительно к электрическому току? Здесь аналогия с гидравликой не помогает. В данном случае стоит представить эффект тока, проходящего через химический раствор. Например, представим, что две медные проволоки погружены в раствор сульфата меди н соединены с положительными и отрицательными полюсами батареи. Ионы медн в растворе, отталкиваясь от положительно заряженной проволоки, проходят к отрицательно заряженному стержню. Положительные ионы меди движутся в направлении условно принятом для тока: от положительного полюса к отрицательному. Одновременно ионы сульфата передвигаются в противоположном направлении и накапливаются на положительно заряженной проволоке. В таком случае направление, заданное току, соответствует направлению, в котором движутся положительные заряды в цепи; отрицательные заряды передвигаются в противоположном направленин.

Аналогия с гидравлнкой также полезна при объяснении источника энергии для тока и понятия электрического **потенциала**. Поток жидкости, изображенный на рис. 1, зависит от разности давления. Движение тока происходит от области высокого давления по направлению к области с низким давлением. При равном давлении в этих областях движение практически отсутствует. Общее давление в цепи обеспечивается использованием энергии насоса. В электрической цепи, изображенной здесь, «электрическое давление», или **потенциал**, обеспечивается **батареей**, в которой запасеиа хнмическая энергия. Гидравлическое давление измеряется в г/см^2, а электрический потенциал в **вольтах**.

Символы, использованные в диаграммах параллельных и последовательных электрических цепей, проиллюстрированы на рис. 2. В соответствин с названиями, **вольтметр** измеряет электрический потенциал и яаляется эквивалентом измерения да-

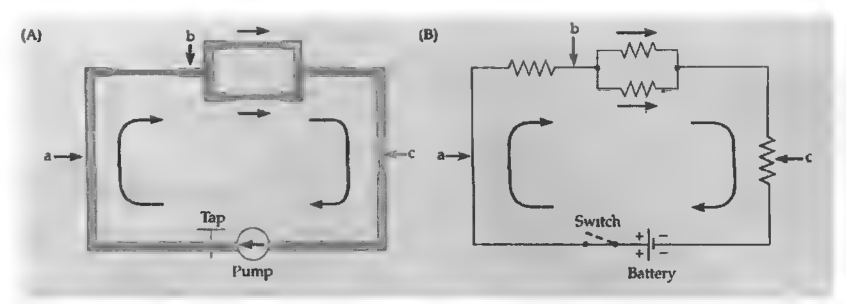


Рис. 1. Гидравлические и электрические цепи. (A, B) соответствующие цепи для для тока воды и электрического тока. Батарея аналогична насосу, который работает при постоянном давлении, переключатель соответствует крану в гидравлической линии, а сопротивления — сужениям трубы.

Fig. 1. Hydraulic and Electrical Circuits. (A, B) Corresponding circuits for the flow of water and of electrical current. A battery is analogous to a pump that operates at constant pressure, the switch to a tap in the hydraulic line, and resistors to constrictions in the tubes.

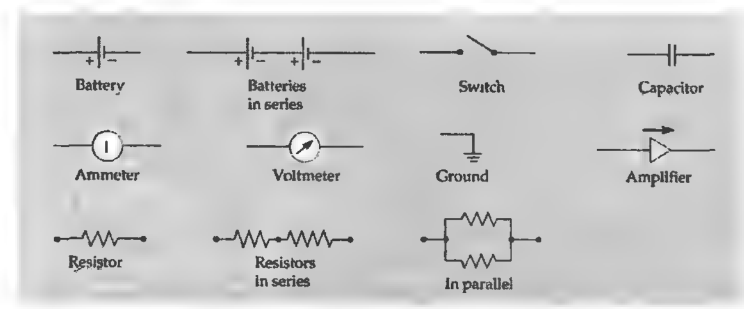


Рис. 2. Обозначения, применяемые в схемах электрических цепей.

Fig. 2. Symbols in Electrical Circuit Diagrams.

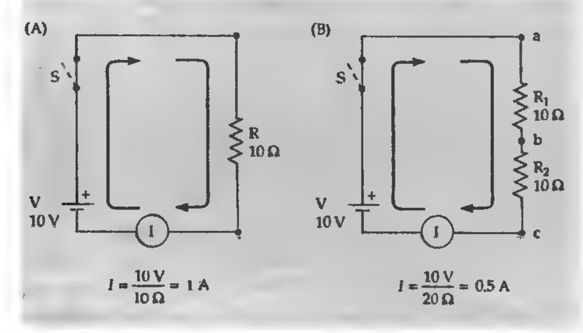


Рис. 3. Закон Ома в простой цепи. (A) Ток $I = (10V)/(10\Omega) = 1A$. (B) Ток $I = (10\,V)/(20\,\Omega) = 0{,}5\,A$, и напряжение на каждом сопротивлении 5 V.

Fig. 3. Ohm's Law applied to simple circuits. (A) Current $I = (10\,V)/(10\,\Omega) = 1\,A$. (B) Current $I = (10\,V)/(20\,\Omega) = 0{,}5\,A$, and the voltage across each resistor is 5 V.

вления в гидравлике; **амперметр** измеряет силу тока в цепи и соответствует флоуметру.

Закон Ома и электрическое сопротивление

В гидравлических системах, по крайней мере в идеальных условиях, количество тока, проходящего через систему, увеличивается с давлением. Отношение между давлеиием и скоростью течения тока определяется **сопротивлением**, собственной характеристикой трубы. Длинные трубы маленького диаметра обладают бóльшим сопротивлением, чем короткие трубы большого диаметра. Аналогичным образом, прохождение тока в электрических цепях зависит от сопротивления цепи. Опять же, тонкие длинные провода обладают бóльшим сопротивлением, чем широкие короткие. Если ток проходит через ионный раствор, его сопротивление увеличится при меньшей концентрации раствора. Это происходит потому, что менее концентрированный раствор имеет меньше ионов, способных переносить электрический ток. В проводниках, таких как металлическая проволока, отношение между током и разностью потенциалов описывается законом Ома, сформулированным в 1820 году. Согласно

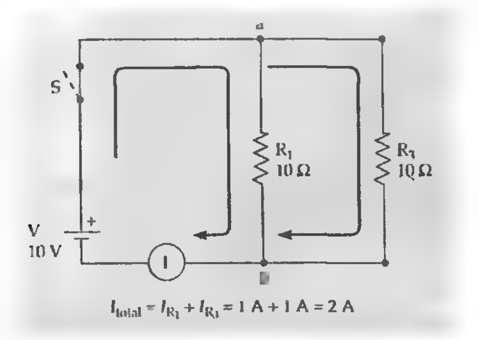


Рис. 4. Параллельные сопротивления. Когда R_1 и R_3 параллельно включены в цепь, падение напряжения на каждом сопротивлении равно 10 V, а общий ток цепи 2 A.

Fig. 4. Parallel Resistors. When R_1 and R_3 are in parallel, the voltage drop across each resistor is 10 V and the total current is 2 A.

этому закону, величина тока I, проходящего через проводник, прямо пропорциональна приложенной к нему разности потенциалов, согласно уравнению $I = V/R$, где R — сопротивление провода. Если I измеряется в амперах, V в вольтах, то единицей измерения R является **ом** (Ом). Величииа, обратная сопротивлению, называется проводимостью, и является отражением того, с какой легкостью проходит ток через проводник. Проводимость обозначается g и равна $1/R$; единицей измерения проводимости является **сименс** (См). Таким образом, закон Ома можно также записать в форме $I = gV$.

Применение закона Ома при расчетах (цепей)

Закон Ома действителеи, когда кривая зависимости тока от потенциала представлена прямой линией. В любом контуре или той его части, для которой выполнено это условие, можно вычислить каждую переменную, если известны две другие. Например:

1. Можно пропустить известный ток через нервную мембрану, измерить изменение потенциала и затем вычислить сопротивление мембраны по формуле $R = V/I$.
2. Измеряя разницу потенциала, производимую неизвестным током, и зная сопротивление мембраны, можно вычислить ток, используя формулу $I = V/R$.
3. Пропустив известный ток через мембрану и зная ее сопротивление, можно вычислить изменение потеициала: $V = IR$.

Необходимо упомянуть два простых, но важных правила (законы Кирхгофа).

1. Алгебраическая сумма всех токов, направленных к одному узлу, равна нулю. Например, в точке а на рис. 4

$$I_{total} + I_{R_1} + I_{R_3} = 0,$$

что означает, что

$$I_{total}(\text{входящий}) = -I_{R1} - I_{R3}(\text{выходящий}),$$

(это просто означает, что заряд не производится и не разрушается в каком-либо месте цепи).

2. Алгебраическая сумма напряжений батарей равна алгебраической сумме всех IR падений напряжения в цепи. Пример этого показан на рис. 3В: $V = IR_1 + IR_2$ (это соответствует закону сохранения энергии).

Теперь мы можем изучить более детально цепи на рис. 3 и 4, которые необходимы для создания модели мембраны. На рис. 3А изображена батарея (V) на 10 вольт, связанная с сопротивлением (резистором) R в 10 Ом. Переключатель S можно размыкать и замыкать, прерывая или устанавливая таким образом прохождение тока. Напряжение на R равно 10 вольт, поэтому ток I, измеренный амперметром, согласно закону Ома, равен 1,0 ампер. На рис. 3В один резистор заменен двумя резисторами R_1 и R_2, соединенными **последовательно**. По первому закону Кирхгофа, ток, входящий в точке **b**, должен быть равен току, выходящему из нее. Поэтому через оба сопротивления должен проходить одинаковый ток I. Согласно второму закону Кирхгофа, $IR_1 + IR_2 = V$ (10 В). Следовательно, ток $I = V/(R_1 + R_2) = 0{,}5$ А. Тогда напряжение в **b** на 5 В больше, чем напряжение в **c**, а в **a** на 5 В больше, чем в **b**. Следует заметить, что, поскольку есть только один путь для тока, полное сопротивление, воспринимаемое со стороны батареи, равно просто сумме сопротивлений двух резисторов, то есть

$$R_{total} = R_1 + R_2.$$

Что произойдет, если, как показано на рис. 4, мы добавим второе сопротивление, также 10 ом, включенное **параллельно**, а не последовательно? В цепи два резистора R_1 и R_2 обеспечивают отдельные пути для тока. Оба находятся под напряжением 10 В, так что соответствующие значения тока будут:

$$I_{R_1} = \frac{V}{R_1} = 1 \text{ A}, \quad I_{R_2} = \frac{V}{R_3} = 1 \text{ A}.$$

Следовательно, для удовлетворения первого закона Кирхгофа в точку а должно поступать 2 А и 2 А должны выходить из точки **b**. Амперметр в таком случае будет показывать 2 А. Комбинированное сопротивление R_1 и R_3 равно $R_{total} = V/I = (10\ B)/(2\ A) = 5$ Ом, или половине отдельных сопротивлений. Это имеет смысл, если подумать об аналогии в гидравлике: две трубы в параллели предоставят меньшее сопротивление потоку, чем одна из этих труб в одиночку. В электрической цепи в параллели проводимости суммируются: $g_{total} = g_1 + g_3$, или $1/R_{total} = 1/R_1 + 1/R_3$.

Если теперь мы обобщим для любого количества (n) резисторов, сопротивления в случае последовательного соедииения просто суммируются:

$$R_{total} = R_1 + R_2 + R_3 + \ldots + R_n.$$

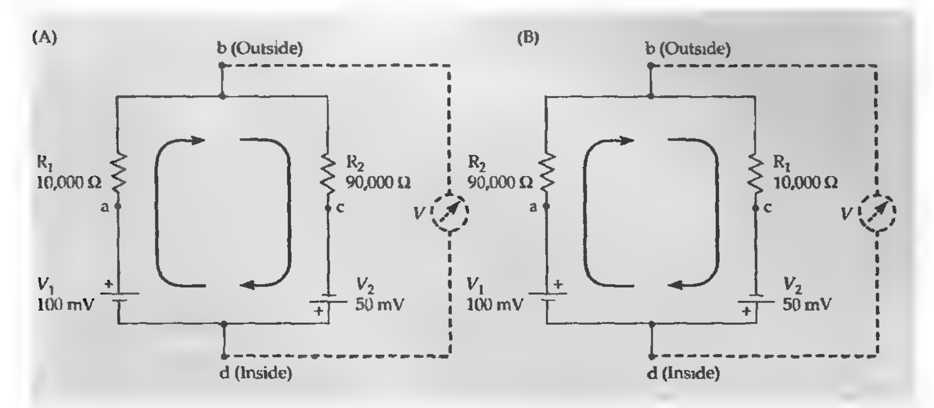


Рис. 5. Аналоговая схема мембраны нервной клетки. На А и В сопротивления R_1 и R_2 поменяны местами, в остальном цепи одинаковы. Источники V_1 и V_2 включены последовательно. На (А) точка b (потенциал «внешней» стороны мембраны) положительно заряжен относительно точки d («внутренняя» сторона) на 85 mV; на (В) — на 35 mV. Эти цепи иллюстрируют как изменения сопротивления изменяют потенциал при неизменном источнике тока (который представляет равновесные потенциалы ионов).

Fig. 5. Analogue Circuits for Nerve Membranes. In A and B the resistors R_1 and R_2 are reversed; otherwise the circuits are the same. The batteries V_1 and V_2 are in series. In (A), point b (the "outside" of the membrane) is positive with respect to d (the "inside") by 85 mV; in (B) it is negative by 35 mV. These circuits illustrate how changes in resistance can give rise to membrane potential changes even though the batteries (which represent ionic equilibrium potentials) remain constant.

А при параллельном соединении сопротивлений складываются обратные величины:

$$\frac{1}{R_{\text{total}}} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + \frac{1}{R_3} + \ldots + \frac{1}{R_n}.$$

Применение анализа цепи к модели мембраны

На рис. 5А показана цепь, сходная с цепями, которые используются для представления нервных мембран. Следует заметить, что две батареи поставляют ток в цепь в одинаковом направлении, и что сопротивления R_1 и R_2 соединены последовательно. Какова разность потенциалов между точками **b** и **d** (которые представляют внутреннюю и внешнюю среду мембраны)? Полная разность потенциалов на двух резисторах между **a** и **c** равна 150 мВ, при этом точка **a** положительна по отношению к **c**. Следовательно, ток протекающий из **a** в **c** через резистор равен 150 мВ/100 000 Ом = 1,5 мкА. Когда 1,5 мкА проходит через 10 000 Ом, как между а и b, происходит падение потенциала в 15 мВ, если точка а положительна по отношению к **b**. Разница потенциалов между внутренней и внешней средой равна, следовательно, 100 мВ − 15 мВ = 85 мВ. Можно получить тот же результат, вычислив падение потенциала после прохождения R_2 (1,5 мкА × 90 000 Ом = 135 мВ) и прибавив его к V_2 (135 мВ − 50 мВ = 85 мВ). Это *должно* быть так, потому что потенциал между **b** и **d** должен иметь единое значение.

На рис. 5В R_1 и R_2 поменялись местами. Так как общее сопротивление в цепи остается прежним, ток тоже должен быть таким же, как на рис. 5А, то есть 1,5 мкА. Теперь падение потенциала после прохождения R_2, между **a** и **b**, равно 90 000 Ом × 1,5 мкА = 135 мВ, точка **a** положительна по отношению к **b**. Теперь потенциал мембраны 100 мВ − 135 мВ = −35 мВ — отрицательный; тот же результат можно, конечно, получить используя ток, проходящий через R_1. Эта простая цепь иллюстрирует важный пункт физиологии мембран: потенциал мембраны может меняться в результате изменения сопротивлений, при том что батареи остаются неизмененными. Общее описание мембранного потенциала в цепи, изображенной на рис. 5А, можно получить таким способом:

$$V_m = V_1 - IR_1.$$

Так как $I = (V_1 + V_2)/(R_1 + R_2)$:

$$V_m = V_1 - \frac{(V_1 + V_2)R_1}{R_1 + R_2}.$$

Преобразовав получим:

$$V_m = \frac{V_1\dfrac{R_2}{R_1} - V_2}{1 + \dfrac{R_1}{R_2}}.$$

Электрическая емкость и постоянная времени

В цепях, изображенных на рис. 3 и 4, замыкание или размыкание ключа производит мгновенные и одновременные перемены тока и потенциала. Конденсаторы вводят в рассмотрение движения тока элемент времени. Они аккумулируют и хранят

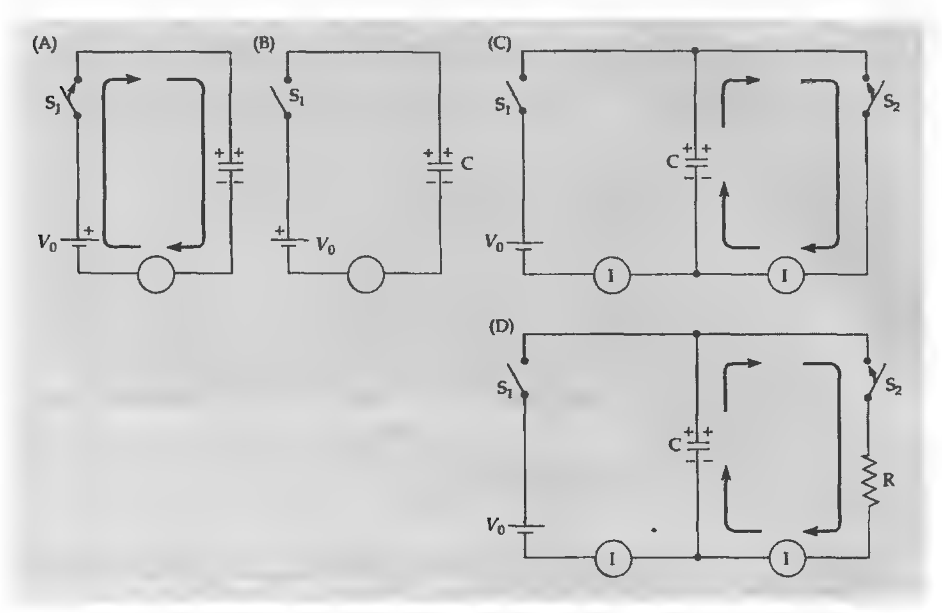


Рис. 6. *Емкости в электрической цепи. А, В и С представляют собой идеальные цепи без сопротивления. Когда ключ S_1* замкнут (А), емкость заряжается мгновенно до напряжения V_0. Если затем S_1 разомкнуть (В), потенциал останется на емкости. Замыкание ключа S_2 (С) мгновенно разряжает емкость. На (D) емкость разряжается через сопротивление R. Максимальный ток разряда $I = V_0/R$.

Fig. 6. Capacitors in electrical circuits. A, B, and C are idealized circuits having no resistance. When S_1 is closed in (A), the capacitor is charged instantaneously to voltage V_0. If S_1 is then opened (B), the potential remains on the capacitor. Closing switch S_2 (C) discharges the capacitor instantaneously. In (D) the capacitor is discharged through resistor R. The maximum discharge current is $I = V_0/R$.

электрический заряд, и когда они присутствуют в цепи, перемены тока и напряжения не будут одновременными. Конденсатор состоит из двух проводящих электричество пластин (обычно металлических), разделенных изолятором (воздухом, слюдой, маслом или пластиком). Когда на пластины прикладывается напряжение (рис. 6А), заряд моментально перемещается с одной пластины на другую по наружной цепи. Однако, когда конденсатор полностью заряжен, ток прекращается, так как он не может проходить через изолятор. **Емкость** (C) конденсатора определяется количеством заряда (q) который он может сохранять на каждый вольт, приложенный к нему:

$$C = \frac{q}{V}.$$

Единица измерения емкости — кулон/вольт, или **фарад** (Ф). Чем больше размер пластинок и чем они ближе друг к другу, тем больше емкость. Конденсатор емкостью 1 фарад очень большой; часто используемые емкости — порядка микрофарад (мкФ) и меньше.

Когда ключ на рис. 6А замыкается, происходит моментальное разделение зарядов на пластинах. Количество заряда, хранящегося в конденсаторе, пропорционально его емкости и величине приложенного к нему напряжения (V_0). Когда ключ размыкается, как на рис. 6В, заряд конденсатора остается, так же как и напряжение (V) между пластинками. (Можно иногда получить неожиданную электротравму от электронной аппаратуры, когда она уже была выключена, потому что некоторые конденсаторы в цепи могут остаться заряженными). Конденсатор можно разрядить замыканием второго переключателя, как показано на рис. 6С. Движение тока опять же будет мгновенным, возвращая заряд и напряжение конденсатора к нулю. Если же разряжать конденсатор через сопротивление (R, рис. 6D), разрядка будет постепенной. Это происходит потому, что сопротивление ограничивает величину тока. Если напряжение в конденсаторе — V, тогда по закону Ома максимальный ток равен $I = V/R$. В цепи без сопротивления величина тока увеличивается, становится бесконечно большой и конденсатор разряжается за бесконечно малый промежуток времени; если сопротивление очень большое, конденсатор разряжается очень долго. Скорость разрядки в данный момент времени, dq/dt, соответствует току, протекающему в этот момент. Иначе говоря, $dq/dt = -V/R$ (с отрицательным знаком, потому что заряд уменьшается со временем), где V, первоначально равное напряжению батареи, уменьшается по мере разряжения конденсатора. Так как $q = CV$, $dq/dt = CdV/dt$,

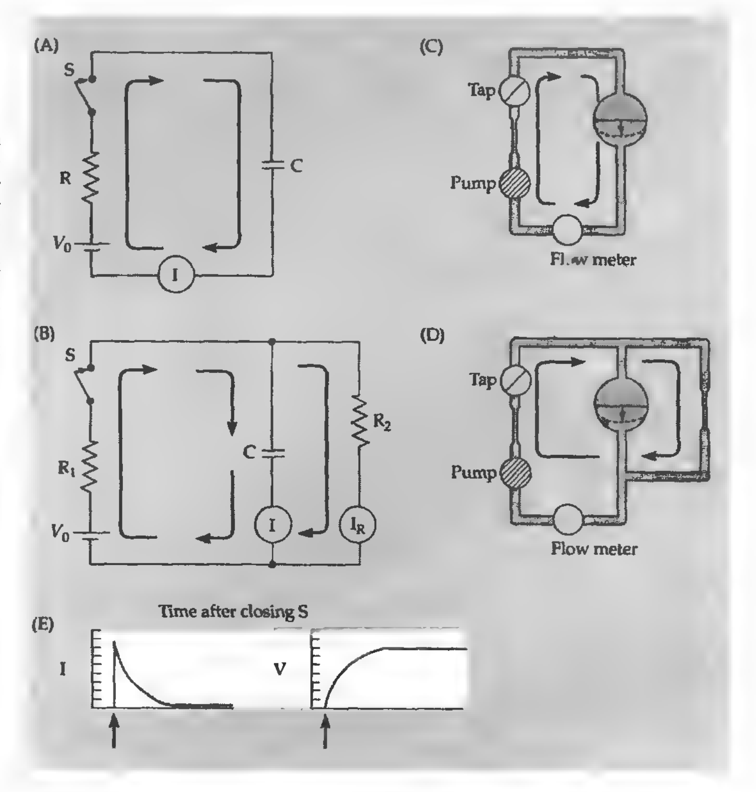


Рис. 7. Зарядка емкости. На (А) емкость заряжается со скоростью, определяемой сопротивлением. На (В) скорость зарядки зависит от двух сопротивлений цепи. На (Е) емкостной ток и напряжение на обкладках емкости показаны как функция времени. Напряжение достигает максимума при полном заряде емкости, то есть когда ток больше не течет через емкость. На (С) и (D) показаны гидравлические аналоги цепей (А) и (В).

Fig. 7. Charging a Capacitor. In (A) the capacitor is charged at a rate limited by the resistor, the initial rate being $I = V_0/R$. In (B) the charging rate depends on both resistors in the circuit. In (E) the capacitative current and the voltage across the capacitor are shown as functions of time. The voltage reaches its final value only when the capacitor is fully charged, i. e., when no more current flows into the capacitor. (C) and (D) are hydraulic analogues of the circuits in A and B.

можно написать $CdV/dt = -V/R$, или

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{V}{RC}.$$

Это уравнение показывает, что темп потери напряжения в конденсаторе пропорционален остающемуся напряжению. Таким образом, при уменьшении напряжения уменьшается скорость разрядки. Постоянная пропорциональности $1/RC$ является константой скорости (темпа) для процесса, RC — это его **постоянная времени**. Подобный процесс постоянно возникает в природе. Например, скорость, с которой вода вытекает из ванной уменьшается при уменьшении глубины и, следовательно, давления на водосток. В этом случае процесс разрядки описывается экспоненциальной функцией

$$V = V_0 e^{-t/\tau},$$

где V_0 — начальный заряд конденсатора, а $\tau = RC$ — постоянная времени. Подобным образом, когда конденсатор заряжается через сопротивление, как показано на рис. 7, процесс зарядки занимает ограниченное время. Напряжение между пластинами увеличивается со временем, пока не достигает напряжения батареи, и ток прекращает проходить. Процесс зарядки станет возрастающим экспоненциально, с постоянной времени $\tau = RC$:

$$V = V_0(1 - e^{-t/\tau}).$$

Данные примеры иллюстрируют другое свойство конденсатора. Ток протекает в конденсатор и из конденсатора только при изменении потенциала:

$$I_c = \frac{dQ}{dt} = C\frac{dV}{dt}.$$

Когда напряжение на конденсаторе постоянно ($dV/dt = 0$), емкостной ток I_c равен нулю. Другими словами, емкость имеет «бесконечное сопротивление» для постоянной разности потенциалов и «низкое сопротивление» для быстро меняющегося потенциала. На рис. 7В показана цепь, в которой ток протекает через сопротивление и конденсатор, соединенные параллельно; на рис. 7Е показан временной ход емкостного тока и напряжения.

Свойства конденсатора в электрической цепи могут быть проиллюстрированы аналогией с немного более усовершенствованной гидравлической системой, изображенной на рис. 7С. Конденсатору соответствует эластичная мембрана, образующая перегородку в заполненной жидкостью камере. Когда открывается кран (пробка), жидкость накачивается с одной стороны камеры в другую. Под действием давления, производимого насосом, мембрана деформируется. Жидкость продолжает течь до тех пор, пока из-за своей эластичности мембрана не станет производить равное и проти-

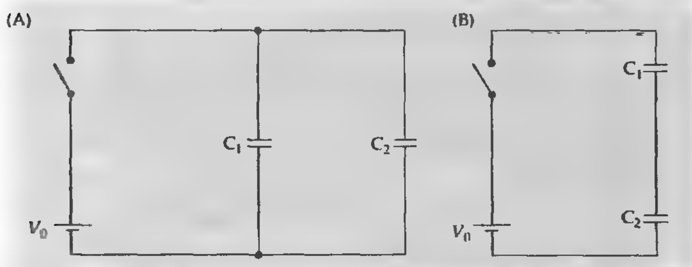


Рис. 8. Сопротивления, включенные параллельно (А) и последовательно (В).

Fig. 8. Capacitors in Parallel (A) and in Series (B).

воположное по направлению давление; тогда жидкость прекращает течь и камера полностью заполнена. Если параллельно поместить трубу так, как показано на рис. 7D, часть жидкости протекает по этой трубе, а часть идет на расширение мембраны. Степень расширения зависит от сопротивления трубы, а также от емкости камеры. Если сопротивление трубы высокое, тогда для определенного потока разность давлений на ее концах будет относительно большой. В таком случае мембрана будет растягиваться сильнее и растяжение займет больше времени. Аналогично, если емкость камеры больше, больше жидкости потребуется для ее заполнения (или «зарядки») и понадобится больше времени для того, чтобы достичь устойчивого состояния. Поэтому типичная константа времени системы определяется произведением сопротивления и емкости.

Если конденсаторы соединены параллельно, как показано на рис. 8А, общая емкость увеличивается. Общий заряд конденсатора является суммой единичных зарядов, находящихся в каждом конденсаторе:

$$q_1 + q_2 = C_1V_0 + C_2V_0,$$

или

$$q_{общ} = C_{общ}V_0,$$

где $C_{общ} = C_1 + C_2$. Напротив, при последовательном соединении конденсаторов емкость уменьшается (рис. 8В). Уравнение оказывается таким же, как и в сопротивлениях, соединенных параллельно. Итак, для n (количества) конденсаторов, соединенных параллельно,

$$C_{общ} = C_1 + C_2 + C_3 + \ldots + C_n,$$

а для соединенных последовательно:

$$\frac{1}{C_{общ}} = \frac{1}{C_1} + \frac{1}{C_2} + \frac{1}{C_3} + \ldots + \frac{1}{C_n}.$$

Приложение В

Метаболические пути синтеза и инактивации низкомолекулярных медиаторов

На нижеприведенных рисунках суммированы основные метаболические пути для низкомолекулярных медиаторов ацетилхолина, ГАМК, глутамата, дофамина, норадреналина, адреналина, серотонина и гистамина. Глицин, пурины, NO и CO не включены, потому что у них нет специализированных нейрональных путей синтеза или распада. На каждом этапе выделена серым часть молекулы, которая изменяется. Более подробную информацию можно найти в следующих специальных работах:

◊ Gilman, A. G., Rall, T., Nies, A. S., and Taylor, P. (Eds.). 1990. *Goodman and Gilmans's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Ed. Pergamon Press, New York.

◊ Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., and Uhler, M. D. (Eds.). 1999. *Basic Neurochemistry*, 6th Ed. Lippincott-Raven, New York.

◊ Stryer, L. 195. *Biochemistry*, 4th Ed., W. H. Freeman, New York.

Acetylcholine (ACH)

Synthesis

$$\underset{\text{Acetyl-CoA}}{H_3C{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}S{-}CoA} + \underset{\text{Choline}}{HO{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{+}{N}{-}(CH_3)_3} \xrightleftharpoons{\text{Choline acetyltransferase}}$$

$$\rightleftharpoons \underset{\text{CoA}}{HS{-}CoA} + \underset{\text{Acetylcholine}}{H_3C{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{+}{N}{-}(CH_3)_3}$$

Degradation

$$\underset{\text{Acetylcholine}}{H_3C{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{+}{N}{-}(CH_3)_3} + H_2O \xrightleftharpoons{\text{Acetylcholinesterase}}$$

$$\rightleftharpoons \underset{\text{Acetate}}{H_3C{-}C({=}O)O^-} + \underset{\text{Choline}}{HO{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{+}{N}{-}(CH_3)_3} + H^+$$

γ-Aminobutyric acid (GABA)

Synthesis

$$\underset{\text{Glutamate}}{{}^{+}H_3N-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-COO^-} \xrightarrow[-\,CO_2]{\text{Glutamic acid decarboxylase}} \underset{\gamma\text{-Aminobutyric acid (GABA)}}{{}^{+}H_3N-CH_2-CH_2-CH_2-COO^-}$$

Degradation

$$\underset{\gamma\text{-Aminobutyric acid (GABA)}}{{}^{+}H_3N-CH_2-CH_2-CH_2-COO^-} \xrightarrow[\alpha\text{-Ketoglutarate} \rightarrow \text{Glutamate}]{\text{GABA } \alpha\text{-oxoglutarate transaminase}} \underset{\text{Succinic semialdehyde}}{OHC-CH_2-CH_2-COO^-} \xrightarrow[H_2O + NAD^+ \rightarrow H^+ + NADH]{\text{Succinic semialdehyde dehydrogenase}} \underset{\text{Succinate}}{{}^-OOC-CH_2-CH_2-COO^-}$$

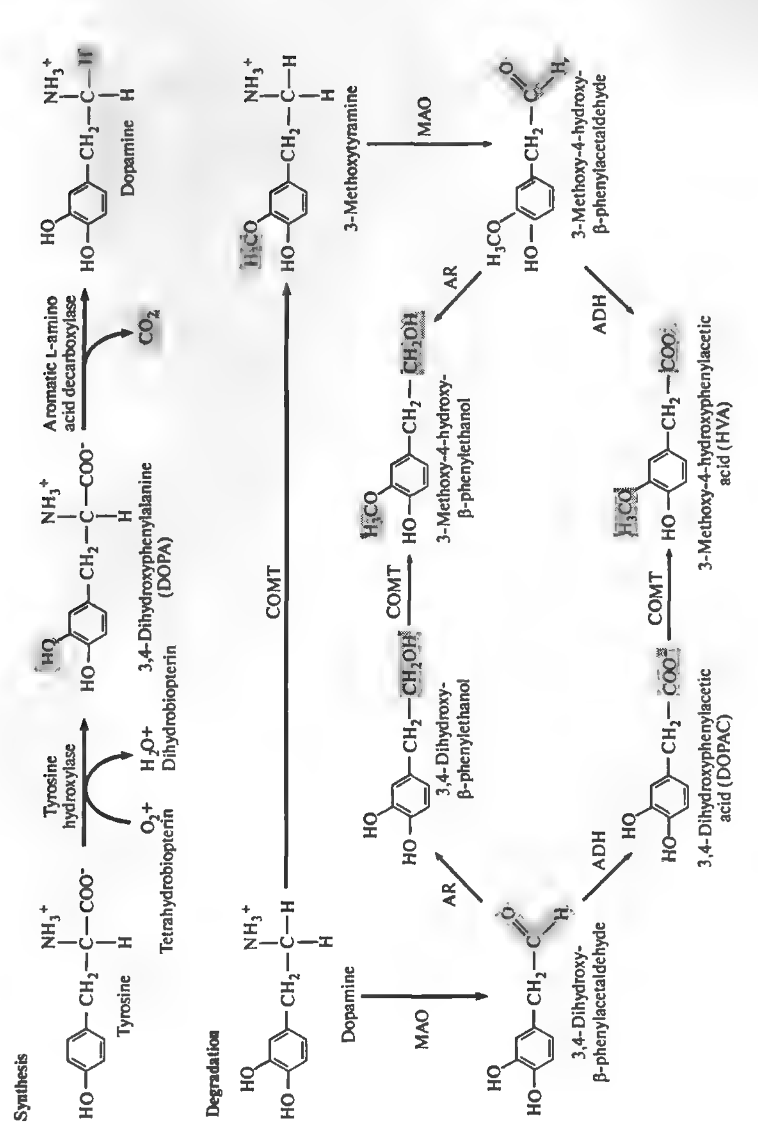
Glutamate

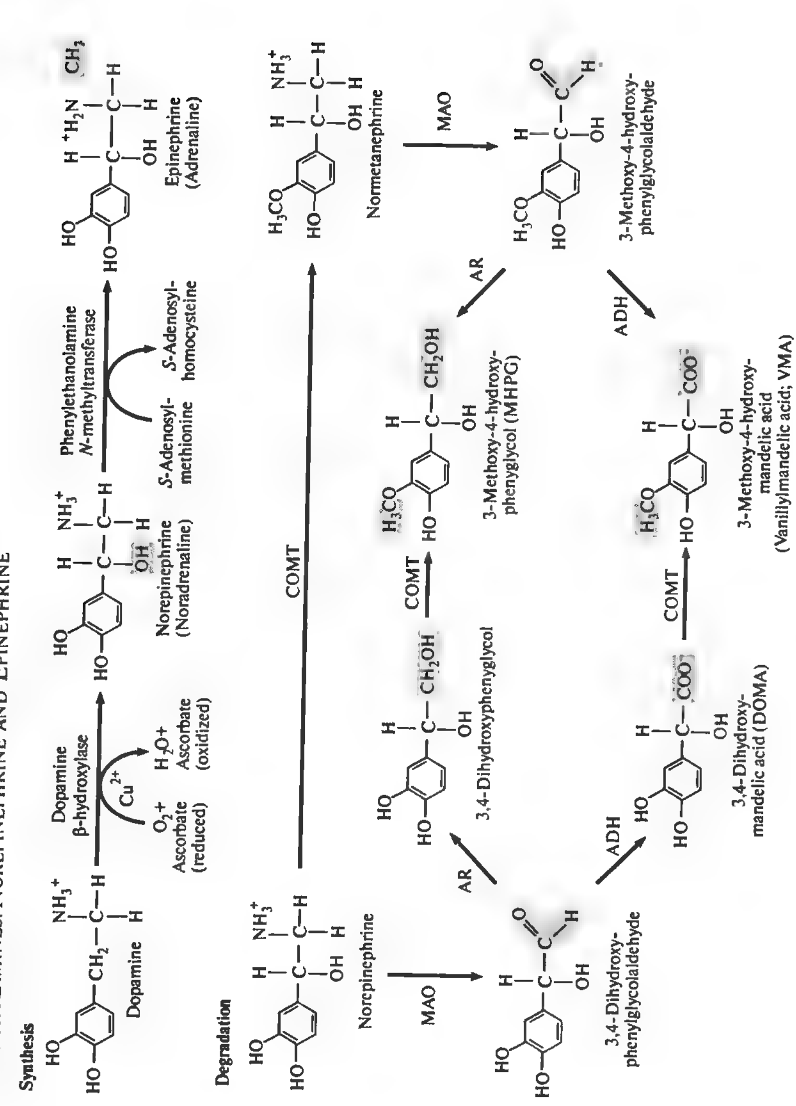
Synthesis

$$\underset{\text{Glutamine}}{{}^{+}H_3N-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-C(=O)NH_2} + H_2O \xrightarrow{\text{Glutaminase}} \underset{\text{Glutamate}}{{}^{+}H_3N-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-C(=O)O^-} + NH_4^+$$

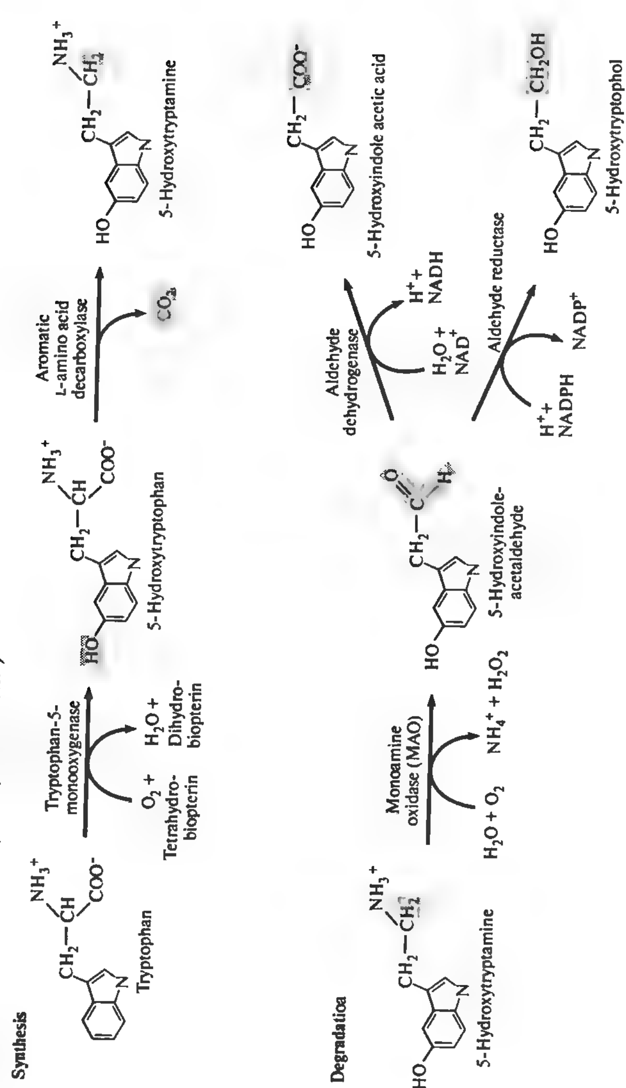
Degradation

$$\underset{\text{Glutamate}}{{}^{+}H_3N-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-C(=O)O^-} + NH_4^+ \xrightarrow[ATP \rightarrow ADP + P_i]{\text{Glutamine synthetase}} \underset{\text{Glutamine}}{{}^{+}H_3N-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-C(=O)NH_2} + H^+$$


Catecholamines: Dopamine
Synthesis
Tyrosine
Tyrosine hydroxylase
O2+ Tetrahydrobiopterin
H2O+ Dihydrobiopterin
3,4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA)
Aromatic L-amino acid decarboxylase
CO2
Dopamine
Degradation
Dopamine
COMT
3-Methoxytyramine
MAO
MAO
3,4-Dihydroxy-β-phenylacetaldehyde
3-Methoxy-4-hydroxy-β-phenylacetaldehyde
AR
ADH
AR
ADH
3,4-Dihydroxy-β-phenylethanol
COMT
3-Methoxy-4-hydroxy-β-phenylethanol
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)
COMT
3-Methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid (HVA)


CATECHOLAMINES: NOREPINEPHRINE AND EPINEPHRINE
Synthesis
Dopamine
Dopamine β-hydroxylase
Cu2+
O2+ Ascorbate (reduced)
H2O+ Ascorbate (oxidized)
Norepinephrine (Noradrenaline)
Phenylethanolamine N-methyltransferase
S-Adenosyl-methionine
S-Adenosyl-homocysteine
Epinephrine (Adrenaline)
Degradation
Norepinephrine
COMT
Normetanephrine
MAO
3,4-Dihydroxy-phenylglycolaldehyde
AR
ADH
3,4-Dihydroxyphenylglycol
3,4-Dihydroxy-mandelic acid (DOMA)
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglycol (MHPG)
3-Methoxy-4-hydroxy-mandelic acid (Vanillylmandelic acid; VMA)
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglycolaldehyde

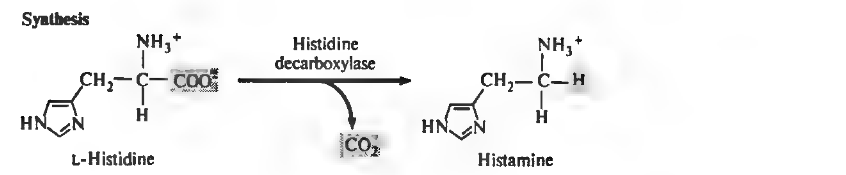
5-Hydroxytryptamine (5-HT; Serotonin)



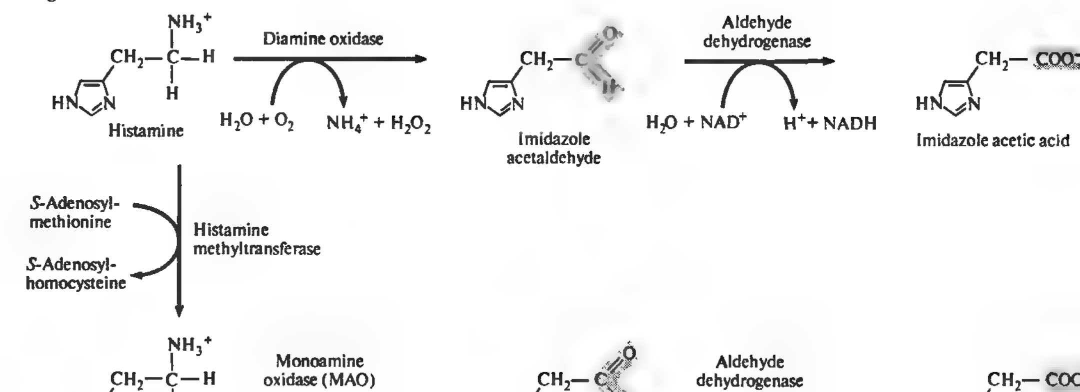


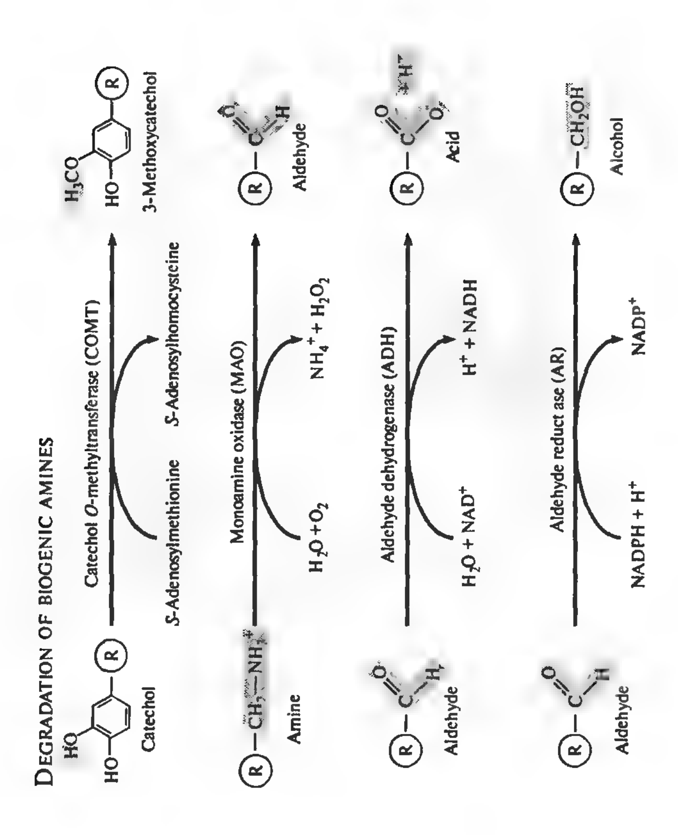
Histamine

Synthesis



Degradation

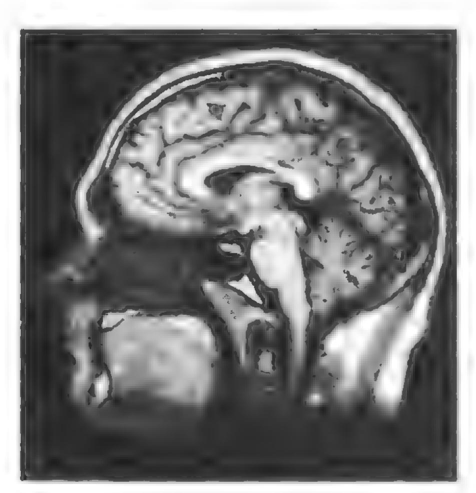



DEGRADATION OF BIOGENIC AMINES
Catechol
Catechol O-methyltransferase (COMT)
S-Adenosylmethionine
S-Adenosylhomocysteine
3-Methoxycatechol
Amine
Monoamine oxidase (MAO)
$H_2O + O_2$
$NH_4^+ + H_2O_2$
Aldehyde
Aldehyde
Aldehyde dehydrogenase (ADH)
$H_2O + NAD^+$
$H^+ + NADH$
Acid
Aldehyde
Aldehyde reduct ase (AR)
$NADPH + H^+$
$NADP^+$
Alcohol

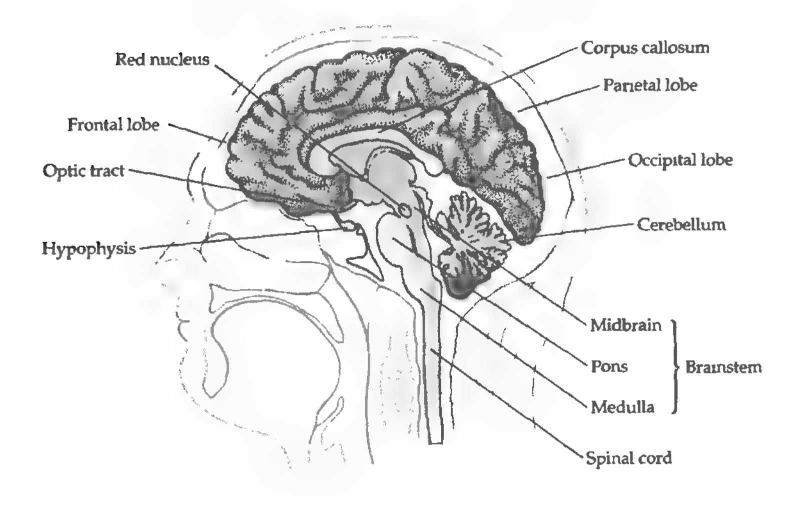
Приложение С

Структуры и пути мозга

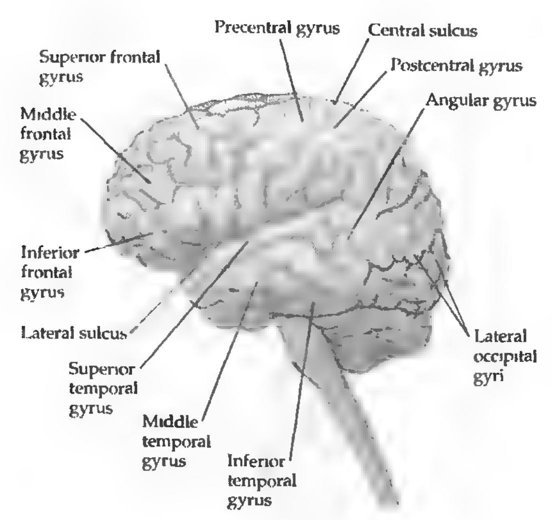
На приведенных ниже рисунках схематически показан мозг в разных аспектах. Цель данного приложения — не повторять атлас, но показать основные структуры, на которых базируется данный в книге материал. Показаны только главные структуры и пути.



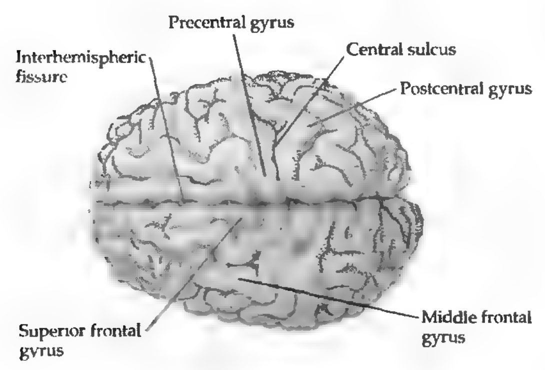
Magnetic resonance image of a living human brain (sagittal section). Copyright 1984 by the General Electric Company. Reproduced with permission.



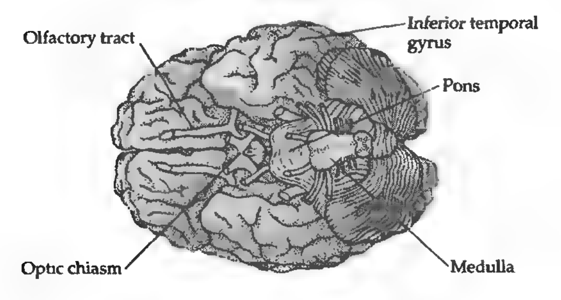
SIDE VIEW



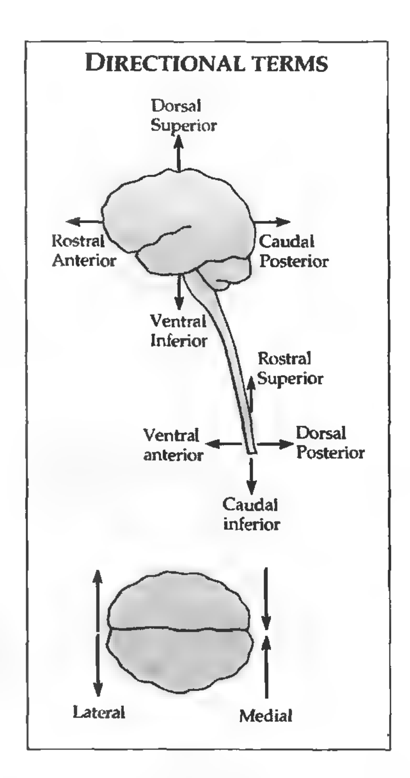
FROM ABOVE



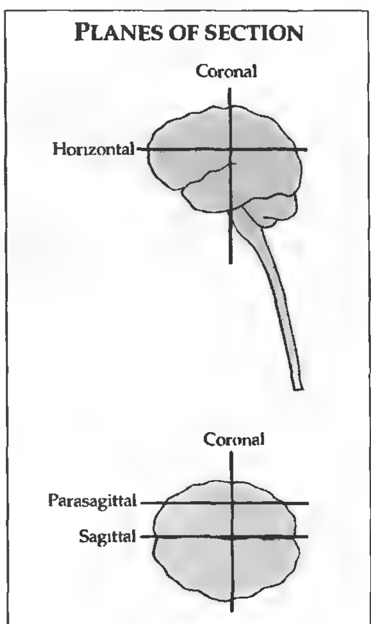
FROM BELOW



DIRECTIONAL TERMS



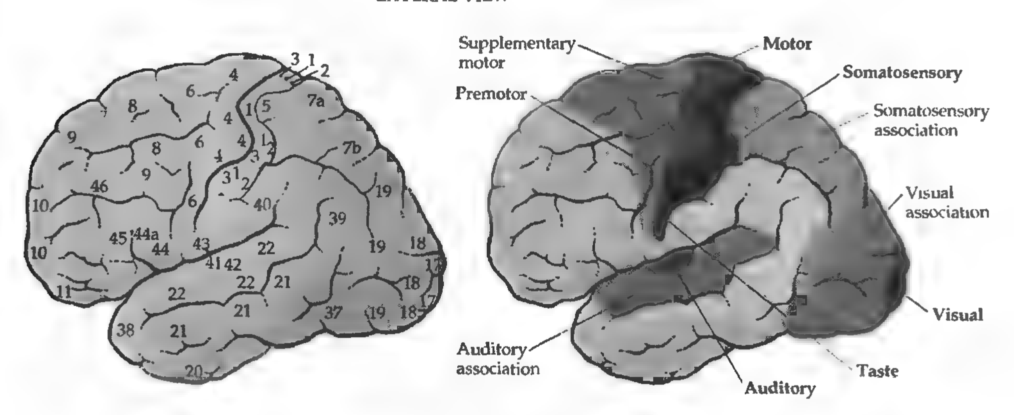
PLANES OF SECTION



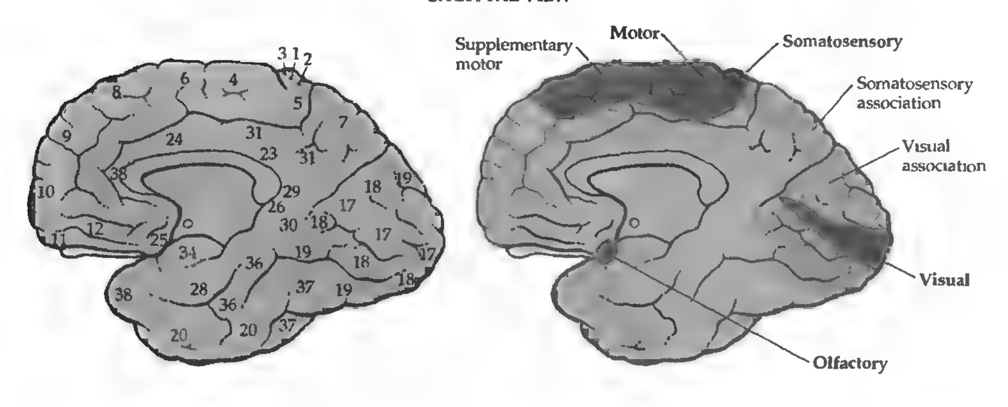
NUMBERED ANATOMICAL AREAS OF THE CEREBRAL CORTEX (BRODMANN'S AREAS)

LOCALIZATION OF MOTOR AND SENSORY FUNCTIONS

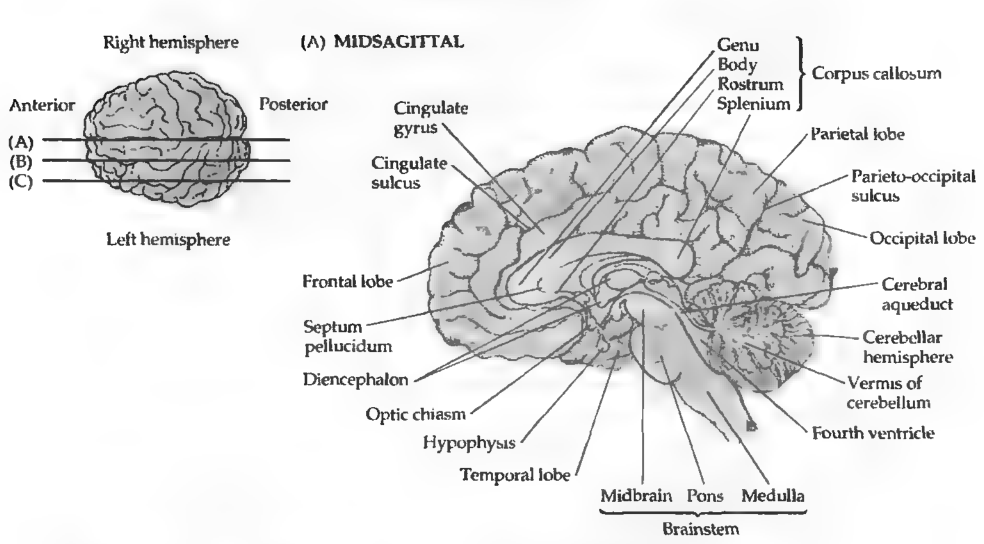
LATERAL VIEW

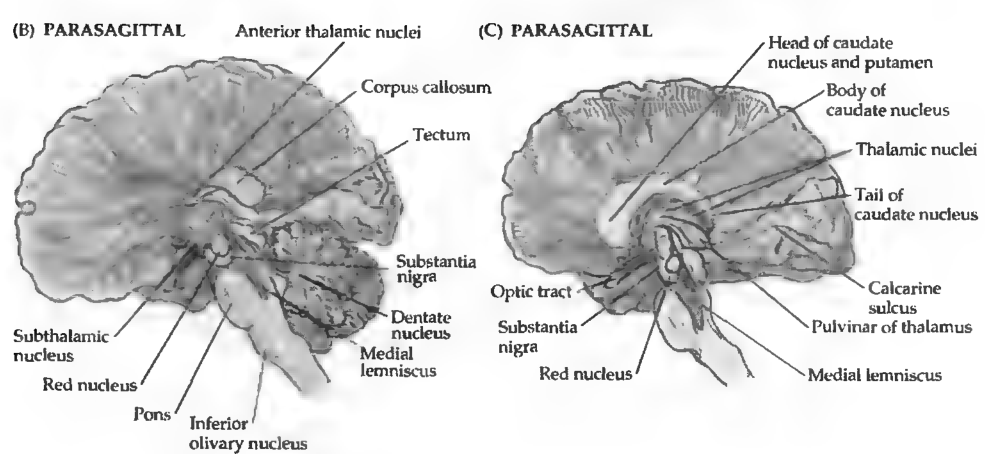


SAGITTAL VIEW

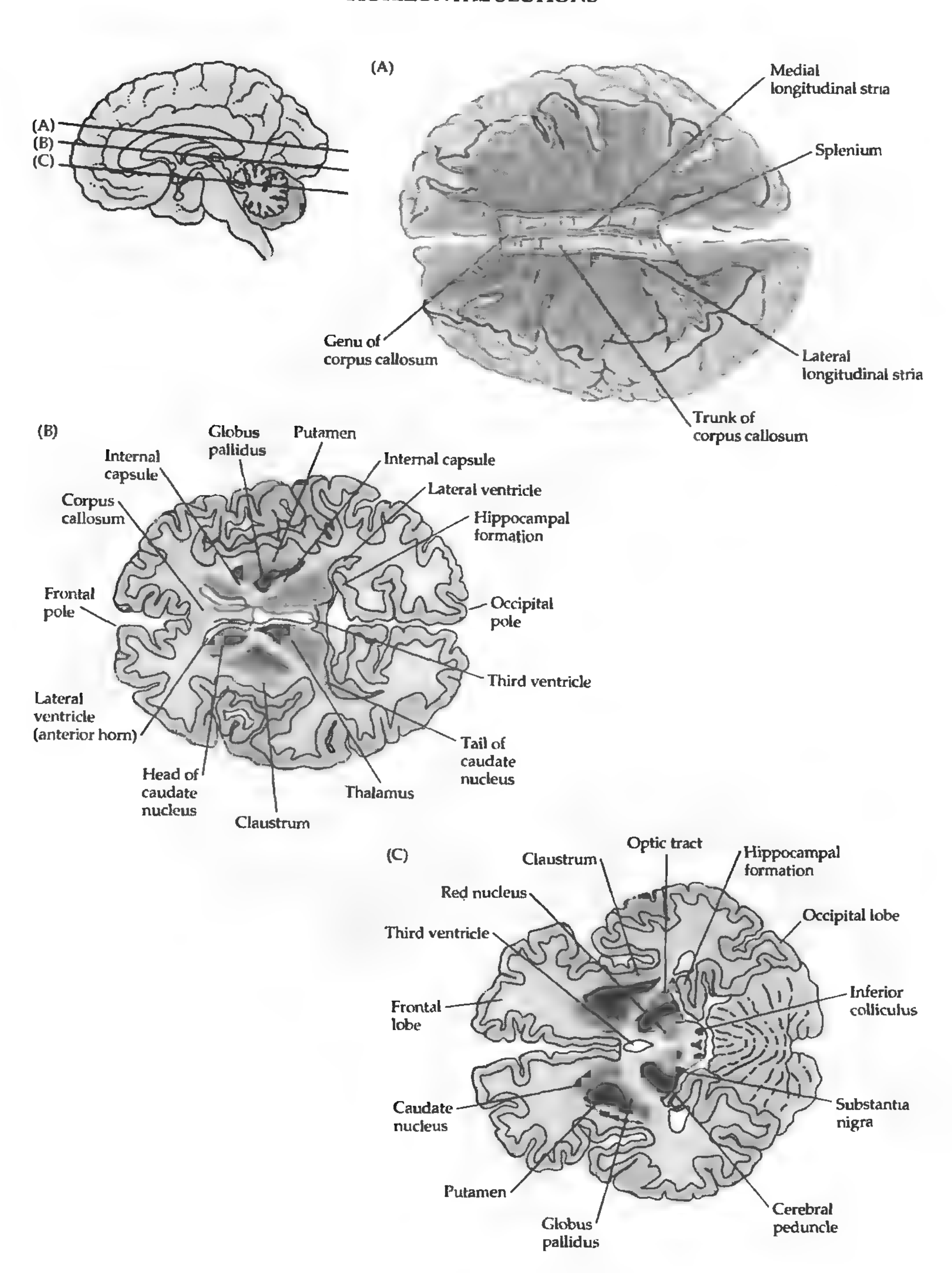


SAGGITAL SECTIONS

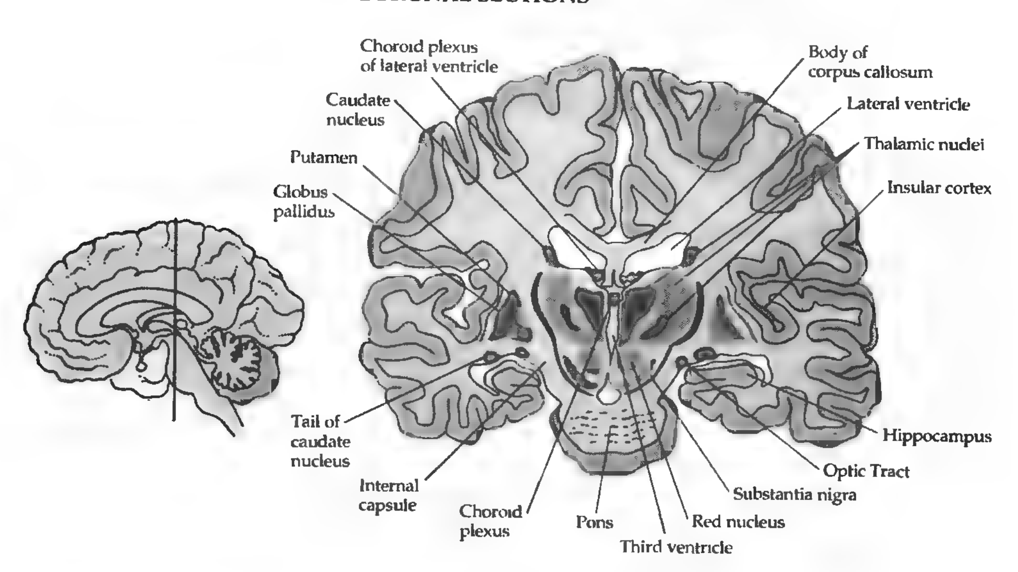




HORIZONTAL SECTIONS



CORONAL SECTIONS



THE CEREBELLUM

SUPERIOR VIEW

Vermis
Anterior lobe
Primary fissure
Posterior lobe

VENTRAL VIEW

Peduncles
Nodulus
Flocculus
Horizontal fissure

CAUDAL VIEW

Flocculus
Anterior
Posterior

MAJOR SENSORY PATHWAYS

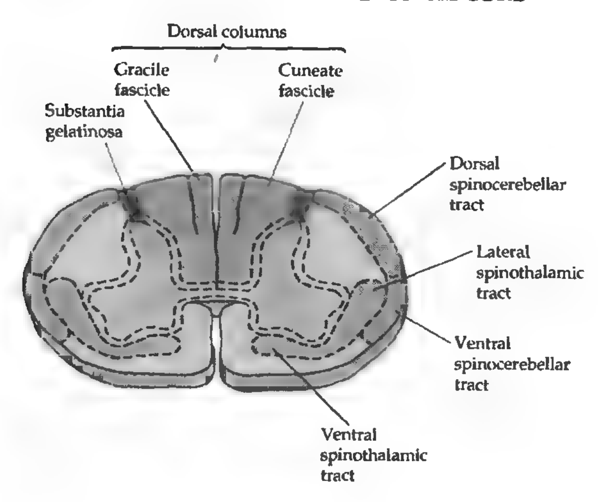
Dorsal column lemniscal pathways
(touch, pressure)

Leg
Somatosensor cortex
Arm
Medial lemniscus
Ventroposterolateral nucleus of the thalamus
Nucleus cuneatus
Nucleus gracilis
Dorsal columns
Arm
Leg

Spinothalamic pathways
(pain, temperature)

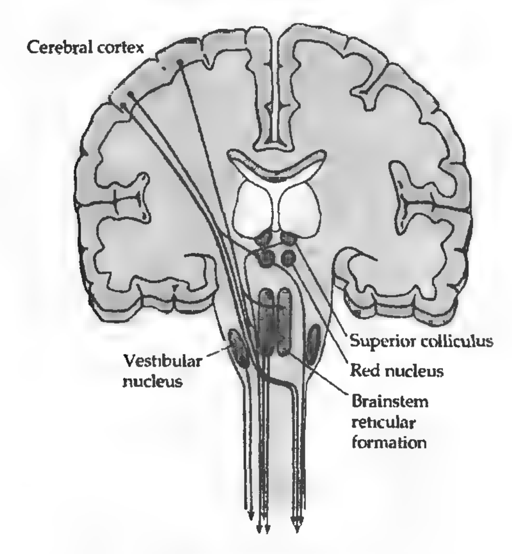
Somatosensory cortex
Central intralaminar nuclei
Ventrobasal nucleus of the thalamus
Brainstem reticular formation
Lateral spinothalamic tract
Ventral spinothalamic tract

CROSS SECTION OF CERVICAL SPINAL CORD

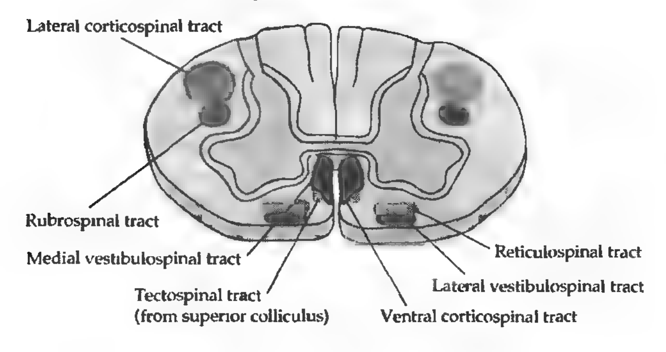


Major motor pathways

Tracts descending to the spinal cord



Cross section of cervical spinal cord



Словарь терминов

Приведенные ниже термины определены только в том их значении, в котором они используются в контексте этой книги; некоторые из них (например **возбуждение, адаптация, торможение**) могут иметь и иной смысл, который мы здесь не рассматриваем.

Автономная нервная система — часть нервной системы, иннервирующая висцеральные органы, кожу, гладкие мышцы, железы и сердце; состоит из симпатической и парасимпатической частей.

Адаптация — ослабление ответа сенсорного нейрона при постоянном раздражении.

Аденилат(ил) циклаза — фермент, катализирующий синтез циклического АМФ из АТФ.

Адреналин — гормон, выделяемый мозговым слоем надпочечников; его действие в некоторых отношениях аналогично влиянию симпатических нервов.

Адренергический — относится к нейронам, продуцирующим норэпинефрин как медиатор.

Аксон — отросток нейрона, проводящий импульсы, обычно на значительные расстояния.

Аксональный транспорт — движение веществ вдоль аксона.

Аксотомия — повреждение аксона.

Аксонная шапочка — специализированная область аксона маутнеровской клетки, окруженная глиальными клетками; место, где происходит электрическое торможение.

Аксонный холмик — область тела нейрона, от которой берет начало аксон; обычно является местом генерации импульсов.

Аксоплазма — внутриклеточная жидкая среда аксона.

Активная зона — область пресинаптической терминали, характеризующаяся плотными скоплениями на цитоплазматической поверхности пресинаптической мембраны и скоплениями синаптических пузырьков; считается местом выброса медиатора.

Активный транспорт — движение ионов или молекул против электрохимического градиента.

Активный транспорт первичный — использует энергию метаболизма.

Активный транспорт вторичный — использует энергию электрохимического градиента для другого иона.

γ-Аминомасляная кислота (ГАМК)—тормозный медиатор в нервно-мышечных синапсах ракообразных и, возможно, в центральной нервной системе позвоночных.

Ампер (А) — единица измерения электрического тока.

Анион — негативно заряженный ион.

Антихолинэстеразы — ингибиторы холинэстеразы (например, нео-стигмин, эзерин); они предотвращают гидролиз ацетилхолина и таким образом продлевают время его действия.

Астроцит — один из видов глиальных клеток ЦНС позвоночных.

Афферентные аксоны — аксоны, проводящие импульсы по направлению к центральной нервной системе.

Ацетилхолин (АХ) — медиатор, освобождаемый из терминалей мотонейронов позвоночных, а также из преганглионарных симпатических и парасимпатических нейронов; гидролизуется холинэстеразой.

Белое вещество — часть центральной нервной ткани, состоящая из миелинизированных нервных волокон.

Биполярная клетка — нейрон, обладающий двумя крупными отростками, отходящими от тела клетки; в сетчатке позвоночных биполяры находятся между слоями рецепторных и ганглиозных клеток.

Биогенные амины — общее название биологически активных аминов, включающее норадреналин, адреналин, дофамин, серотонин и гистамин.

Бляшка — небольшое концевое утолщение пресинаптического нервного волокна; является местом освобождения медиатора.

α-Бунгаротоксин — токсин из яда змеи *Bungarus multicinctus*; прочно связывается с рецепторами ацетилхолина.

Вегетативная нервная система — часть нервной системы, иннервирующая внутренние органы, кожу, гладкую мускулатуру, железы и сердце; в ней различают два отдела: парасимпатическую и симпатическую нервную систему.

Возбуждение — процесс, ведущий к генерации потенциала действия.

Воротный ток — изменение заряда элементов клеточной мембраны, связанное с открытием или закрытием каналов.

ВПСП — возбуждающий постсинаптический потенциал в нейроне.

Вставочный нейрон — нейрон, который не является ни сенсорным, ни двигательным, а осуществляет связь между другими нейронами.

Ганглий — обособленное скопление нервных клеток, находящееся (у позвоночных) вне центральной нервной системы.

Гематоэнцефалический барьер — термин, означающий ограничение доступа веществ к нейронам и глиальным клеткам внутри мозга.

Генераторный потенциал — градуальный местный сдвиг потенциала в сенсорном рецепторе, вызываемый адекватным стимулом.

Гиперполяризация — увеличение мембранного потенциала по сравнению с уровнем покоя; сопровождается снижением возбудимости.

Глия см. *Нейроглия*.

Дальтон — единица молекулярной массы (Da), равная 1/12 массы атома углерода.

Датчик — устройство для преобразования одной формы энергии в другую (например микрофон, фотоэлемент).

Двигательная единица — одиночный мотонейрон вместе с мышечными волокнами, которые он иннервирует.

Дендрит — отросток нервной клетки, специализированный для восприятия сигналов; часто является постсинаптической областью нейрона.

Деполяризация — уменьшение мембранного потенциала по сравнеиию с уровнем покоя.

Диацилглицерол — (DAG), внутриклеточный вторичный посредник, образуемый при гидролизе фосфолипидов с участием фосфолипазы С; активирует протеинкиназу С.

Дивергенция — ветвлеиие отростков нейрона с образованием синапсов иа нескольких (или многих) других нейронах.

Доминирование глаза — большая эффективность раздражения одного из двух глаз при возбуждении простых, сложных и сверхсложных клеток зрительной коры.

Емкость мембраны (C_m) — способность клеточной мембраны накапливать и разделять заряды; измеряется в фарадах (Ф). От емкости мембраны зависит временной ход пассивио распространяющихся потенциалов.

Желудочки — полости в мозгу, заполненные спинномозговой жидкостью; стенки желудочков выстланы эпендимальными клетками.

Зрительный перекрест (хиазма)—место перекрещивания части волокон зрительных нервов. У кошки и у приматов волокна от медиальной области сетчатки идут к латеральному коленчатому телу противоположной стороны.

Импульс см. *Потенциал действия*.

Инактивация — градуальное снижение проводимости мембраны (например для натрия), вызываемое деполяризацией.

Интеграция — суммирование нейроном различных возбуждающих и тормозиых влияний, которые на нем конвергируют; приводит к генерации выходного сигнала.

Интрафузальное волокно — мышечное волокно, входящее в состав веретена; его сокращение приводит к генерации или модуляции сенсорного разряда.

Ионофорез — перенос ионов током, проходящим через микропипетку; используется для строго локализованного во времени и пространстве подведения заряженных молекул.

Ипсилатеральный — относящийся к той же стороне тела.

Катехоламины — общее название молекул, имеющих катехольное кольцо и аминогруппы; обычно имеются в виду дофамин, норадреналин и адреналин.

Катион — положительно заряженный ион.

Каудальный — задний (у животных).

Квантовое освобождение медиатора — выделение многомолекулярных порций (квантов) медиатора из пресинаптических нервных терминалей.

кДНК — комплементарная ДНК, синтезируемая обратной транскриптазой по последовательности РНК.

Клон — потомство одиой клетки.

Колонки коры — группы корковых нейронов, обладающих одинаковыми свойствами (например, в отношении сенсорной модальности, положения или ориентации рецептивного поля и т. п.).

Конус роста — кончик растущего аксона.

Конвергенция — объединение выходов группы пресинаптических иейронов благодаря образованию синапсов на одном и том же постсинаптическом нейроне.

Контралатеральный — относящийся к противоположной стороне тела.

Концевая пластинка — постсинаптическая область скелетиого мышечного волокиа у позвоночных.

Кулон — единица измерения электрического заряда.

Кураре — экстракт растения, блокирующий никотиновые АХ рецепторы.

Латеральное коленчатое тело — ядро, которое находится в задне-нижней части таламуса и осуществляет функцию реле в зрительном пути.

Маутнеровская клетка — крупный, длиной до 1 мм, нейрон в среднем мозгу рыб и амфибий.

Медиатор — вещество, которое освобождается из нервных терминалей и воздействует на мембрану постсинаптической клетки, обычно вызывая повышение проницаемости мембраны для определенных ионов.

Межклеточные щели — узкие, заполненные жидкостью пространства между мембранами соседних клеток; обычно их ширина составляет около 20 нм.

Миелиновая оболочка — обладающая высоким сопротивлением оболочка вокруг аксона, образованная слившимися мембранами шванновских или глиальных клеток.

Миниатюрный потенциал концевой пластинки — небольшая деполяризация постсинаптической мембраны мышечного волокна, вызываемая спонтанным освобождением одиночного кванта медиатора из пресинаптической терминали.

Модальность — род ощущений (например осязание, зрение, обоняние).

Мотонейрон (двигательный нейрон) — нервная клетка, аксон которой иннервирует мышечные волокна.

Мышечное веретено — концевой орган в составе скелетной мышцы, от которого берут начало афферентные сенсорные волокна и на котором образуют окончания несколько мотонейронов.

Начальный сегмент — участок аксона, примыкающий к телу клетки; часто является местом генерации нервных импульсов.

Нейроглия — совокупность клеток-сателлитов, ассоциированных с нейронами. В центральной нервной системе млекопитающих нейроглия образована двумя основными видами клеток — астроцитами и олигодендроцитами; в периферических нервах клетки-сателлиты называются шванновскими клетками.

Нейропиль — сплетение тонких аксонов и дендритов; содержит большое число синапсов.

Неостигмин — ингибитор холинэстеразы; синоним — простигмин.

Норадреналин — медиатор, освобождаемый из большинства симпатических нервных терминалей.

Облегчение — повышение эффективности синаптической передачи, которое вызывают следующие друг за другом нервные импульсы; обычно обусловлено увеличением количества освобождаемого медиатора.

Овершут — реверсия мембранного потенциала в тот момент, когда потенциал действия достигает максимальной амплитуды.

Ома закон — устанавливает соотношение между током (I), разностью потенциалов (V) и сопротивлением (R); $I = V/R$.

Ось ориентации поля — угол наклона продольной оси рецептивного поля (например горизонтальная ось, вертикальная, косая) простых, сложных и сверхсложных нейронов коры.

Перехваты Ранвье — небольшие участки миелинизированного аксона, лишенные миелина и повторяющиеся через регулярные промежутки.

Пероксидаза хрена — фермент, используемый в качестве гистохимического маркера для выявления отростков нейронов или межклеточных пространств.

Потенциал концевой пластинки (ПКП) — синаптический потенциал в скелетном мышечном волокне, вызываемый ацетилхолином, освобождающимся из пресинаптических терминалей.

Положительный следовой потенциал — кратковременная гиперполяризация, наступающая вслед за потенциалом действия; обусловлена повышением калиевой проводимости.

Поля 17, 18, 19 — зрительные области коры больших полушарий; различаются по определенным гистологическим и физиологическим критериям.

Порог — 1) критическая величина мембранного потенциала, деполяризация, при которой возникает импульс; 2) минимальная сила раздражения, достаточная для того, чтобы вызвать ощущение.

Постсинаптическое торможение — торможение, опосредованное изменениями в постсинаптической клетке.

Постоянная времени (τ) — мера скорости нарастания или спада местного градуального потенциала; зависит от сопротивления и емкости мембраны.

Постоянная длины — расстояние вдоль аксона или мышечного волокна (обычно измеряемое в миллиметрах), после прохождения которого местный градуальный потенциал уменьшается до $1/e$ своей исходной амплитуды.

Потенциал действия — кратковременный регенеративный электрический потенциал, распространяющийся вдоль аксона или мышечного волокна по принципу «все или ничего».

Потенциал покоя — устойчивый уровень трансмембранного электрического потенциала в отсутствие возбуждения.

Потенциал реверсии — уровень мембранного потенциала, при котором медиатор не вызывает никакого сдвига потенциала.

Потенциал связи — синаптический потенциал, возникающий в результате прохождения тока через электрический синапс.

Пресинаптическое торможение — торможение, опосредованное влияниями на пресинаптическую терминаль.

Проводимость — величина, обратная электрическому сопротивлению; характеризует способность цепи проводить электричество; служит для измерения проницаемости мембран возбудимых клеток для определенных ионов. Обозначается символом g; единицей измерения служит $Ом^{-1}$ (сименс).

Проницаемость — способность мембраны пропускать вещества в клетку или из клетки.

Равновесный потенциал — уровень мембранного потенциала, вычисляемый с помощью уравнения Нернста из разности между наружной и внутренней концентрациями ионов, для которых мембрана проницаема.

Рефлекс — непроизвольное движение или иная периферическая реакция, вызываемая периферическим стимулом и опосредуемая через центральную нервиую систему.

Рефрактерности период — определенный период после нервиого импульса, в течеиие которого следующий стимул не может вызвать импульс.

Рецептивное поле — периферическая область, раздражение которой оказывает влияние на разряд даиного иейрона. Для иейронов зрительного пути рецептивное поле представляет собой область сетчатки, освещение которой сказывается на активности иейроиа.

Рецептор — 1) сенсориое нервное окончаиие; 2) молекула в составе клеточной мембраны, вступающая в соедииение со специфическим веществом — медиатором.

Реципрокная иннервация — связи между нейронами, организованиые таким образом, что те же пути, через которые осуществляется возбуждение одиой группы мышц, обеспечивают торможеиие мотонейронов мышц-антагонистов.

Рингера раствор — сбалансированиый солевой раствор, содержащий NaCl, KCl и $CaCl_2$; назваи по имени Сиднея Риигера.

Сагиттальный разрез — вертикальный разрез в передие-задием иаправлении.

Сальтаторное проведение — проведение вдоль миелииизированиого аксона, при котором импульс перескакивает от перехвата к перехвату.

Сверхчувствительность — повышенная чувствительность к медиаторам денервированных нейронов, желез, мышечиых волокон.

Серое вещество — часть центральной нервной ткани, образованная преимущественно телами нервных клеток и тонкими нервными окончаниями (в отличие от белого вещества, состоящего из крупных нервных путей).

Серотонин — 5-окситриптамии, служит медиатором в нервиой системе моллюсков, а возможно, и в центральиой иервиой системе позвоночных.

Синапсы — места функциоиальиых контактов, образуемых иейронами; термин был предложен Шерринттоиом.

Синаптическая щель — пространство между мембраиами пре- и постсинаптической клетки, через которое должеи диффундировать медиатор (в химическом сииапсе).

Синаптические пузырьки — иебольшие, окруженные мембраной пузырьки, находящиеся в нервных терминалях. Пузырьки с электрониоплотной сердцевиной содержат катехоламины и серотонии; прозрачные пузырьки считаются хранилищами других медиаторов, освобождаемых из термииалей.

Сосудистое сплетение — богатое кровеиосными сосудами ворсинчатое образование, которое выдается в полость мозгового желудочка и секретирует спинномозговую жидкость.

Спинномозговая жидкость (СМЖ) — прозрачная жидкость, заполняющая мозговые желудочки и пространства между твердой, паутииной и мягкой оболочками. См. *Субарахноидальное пространство*, *Желудочки*.

Стриарная кора (называется также полем 17 или зрительным полем 1) — первичная зрительная область затылочиой доли мозга, различаемая невооруженным глазом по полосам Геннари.

Субарахноидальное пространство — заполненное спинномозговой жидкостью пространство между двумя слоями соедииительной ткаии — оболочками, окружающими мозг.

Тесный контакт — место слияния иаружных слоев мембран прилегающих клеток, где образуется пятислойиое соединение. Называется *macula occludens*, если область соединения представляет ограничениое «пятно», и *zonula occludens*, если она имеет форму кольца. Такие соединения исключают перемещение веществ через межклеточное пространство.

Тетраэтиламмоний — четвертичное аммониевое соедииеиие, которое избирательно блокирует каналы калиевой проводимости в нейроиах и мышечных волокнах.

Тетродотоксин — токсин из яда рыбы-иглобрюха, который избирательно блокирует регенеративные каиалы натриевой проводимости в нейронах и мышечиых волокнах.

Торможение — влияние одного нейрона на другой, затрудняющее генерацию импульсов.

Постсинаптическое торможение осуществляется путем сдвига проводимости мембраны постсинаптической клетки, который не позволяет мембранному потенциалу достигать порогового уровня.

Пресинаптическое торможение вызывается тормозным волокном, которое оканчивается на возбуждающей терминали и уменьшает количество освобождаемого из нее медиатора.

Электрическое торможение осуществляется с помощью генерируемых в пресинаптических волокнах токов, которые гиперполяризуют постсинаптическую клетку; этот процесс не связан с освобождением химического медиатора.

ТПСП — тормозный постсинаптический потенциал в нейроне.

Уабаин — О-строфантидин, гликозид, специфически блокирующий сопряженный иатрийкалиевый насос.

Фарад (Ф) — единица измерения емкости; равиа емкости кондеисатора, который имеет заряд 1 кулон при разности потенциалов между пластинами 1 В. На практике обычно используют микрофарады (мкФ).

Фарадея число (постоянная Фарадея) — количество электричества, которое, проходя через электролит, вызывает химическое превращение 1 граммэквивалента вещества у каждого электрода; равно 96 500 кулонам.

Фиксация потенциала — метод, позволяющий мгновенно смещать мембранный потенциал до нужного уровня и поддерживать его на этом уровне, одновременно измеряя ток, протекающий через клеточную мембрану; разработан Коулом и Мармонтом.

Фронтальный разрез — разрез, проходящий через череп под прямым углом к продольной (сагиттальной) оси.

Фузимоторные нейроны — мотонейроны, иннервирующие мышечные волокна веретен.

Харибдотоксин — токсин скорпионов, который блокирует калиевый канал.

Хиазма см. *Зрительный перекрест.*

Химера — экспериментально полученный эмбрион или орган, происходящий из двух или более генетически различных источников.

Халинэргические нейроны — нейроны, освобождающие в качестве медиатора ацетилхолин.

Центральная область сетчатки — у кошки это область сетчатки, обладающая наилучшей дискриминацией; содержит колбочки.

Центральная ямка — углубление в центре сетчатки, где отсутствуют палочковые элементы; область наибольшей остроты зрения.

Центрифугальный контроль — регулирование функции сенсорных органов аксонами центральных нейронов.

Шванновская клетка — клетка-сателлит в периферической нервной системе; участвует в формировании миелиновой оболочки.

Щелевой контакт — область контакта между клетками, в которой пространство между прилегающими мембранами сужено примерно до 2 нм; место электрической связи.

Эзерин — ингибитор холинэстеразы; синоним — физостигмин.

Экзоцитоз — процесс слияния синаптических пузырьков с мембраной и выделения содержимого наружу.

Экстрафузальные мышечные волокна — волокна, составляющие основную массу скелетной мышцы (кроме мышечных веретен).

Электрогенный натриевый насос — активный транспорт ионов из клетки, вызывающий появление трансмембранного тока и увеличение мембранного потенциала.

Электроретинограмма (ЭРГ) — запись колебаний потенциала, возникающих в ответ на световые стимулы; ее отводят при помощи электродов, накладываемых на глаз.

Электротонические потенциалы — местные градуальные потенциалы, вызываемые подпороговыми токами; их характеристики зависят от пассивных электрических свойств клеток.

Электроэнцефалограмма (ЭЭГ) — запись электрической активности мозга при помощи внешних электродов, приложенных к черепу.

Эндоцитоз — захват экстраклеточной среды путем инвагинации мембраны внутрь.

Эндотелиальные клетки — клетки, выстилающие кровеносные сосуды.

Эпендима — слой клеток, выстилающих мозговые желудочки и центральный канал спинного мозга.

γ-Эфферентное волокно — тонкий миелинизированный двигательный аксон, иннервирующий интрафузальное мышечное волокно. См. *Фузимоторные нейроны.*

Эфферентные аксоны — нервные волокна, проводящие импульсы из центральной нервной системы на периферию.

Часто встречаемые сокращения

АХ — ацетилхолин
АХР — ацетилхолиновый рецептор
ВПСП — возбуждающий постсинаптический потенциал
ГАМК — гамма-аминомасляная кислота
ГМ — головной мозг
ГДП — гуанозиндифосфат
ГТФ — гуанозинтрифосфат
НС — нервная система
ЦНС — центральная нервная система
ДВП — долговременная потенциация
ДВД — долговременная депрессия
ПД — потенциал действия
мРНК — мессенджер РНК (рибонуклеиновая кислота)
МП — мембранный потенциал
МПКП — миниатюрные потенциалы концевой пластинки
ПКП — потенциал концевой пластинки
СОГ — сухожильный орган Гольджи
ТЭА — тетраэтиламмоний
ТПСП — тормозный постсинаптический потенциал
ЦАМФ — циклический аденозин монофосфат

Указатель определений основных терминов